

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**CONSTRUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN *IN VITRO* DE UN
SISTEMA DE HIDROGEL BIOACTIVO PARA EL CRECIMIENTO DE
LAS CÉLULAS DE LA FRACCIÓN VASCULAR ESTROMAL DE
TEJIDO ADIPOSO**

Tesis presentada por:

L.B.G SUSANA GABRIELA CÁRDENAS RAMOS

ASESOR: DRA. C. LIZETH ALICIA FUENTES MERA

Como requisito parcial para obtener el grado de MAESTRO EN CIENCIAS con
Orientación en Biología Molecular e Ingeniería Genética

MONTERREY, N. L.

JUNIO, 2019

Construcción y caracterización *in vitro* de un sistema de hidrogel bioactivo para el crecimiento de las células de la fracción vascular estromal de tejido adiposo

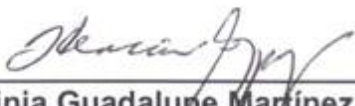
Aprobación de la tesis:



Dra. C. Lizeth Alicia Fuentes Mera
Director de Tesis



Dr. med. Jorge Ocampo Candiani
Co-Director de Tesis



Dra. C. Herminia Guadalupe Martínez Rodríguez
Comisión de Tesis



Dr. med. Felipe Arturo Morales Martínez
Subdirector de Estudios de Posgrado

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Medicina Regenerativa del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL); bajo la dirección de la Dra. C. Lizeth Alicia Fuentes Mera y la co-dirección del Dr. med. Jorge Ocampo Candiani.

La preparación de las muestras para el análisis por microscopía electrónica de barrido se realizó en el departamento de Embriología de la Facultad de Medicina a cargo del Dr. med. Norberto López Serna; las fotografías se tomaron en el Centro de Investigación e Innovación en Ingeniería Aeronáutica (CIIIA) con la colaboración de la M.C. María Lara Banda, ambos de la UANL.

Los cortes por congelación y tinciones histológicas se realizaron en el área de Cirugía Dermatológica del Departamento de Dermatología del Hospital Universitario “José E. González bajo la tutoría del M.C. Víktor Romero Díaz.

AGRADECIMIENTOS

Primeramente a **Dios** por el regalo de la vida y por ponerme a las personas indicadas a lo largo de este camino y en el lugar preciso donde me he desarrollado tanto personalmente como académicamente.

A mis **Padres**, el Sr. **Cárlos Cárdenas** y la **Sra. Patricia Ramos**, por su apoyo en todo momento; mis **Hermanos Karla y Polito** y especialmente a mis **Sobrinos, Danita y Gael**, por darme esa chispa de alegría en cada momento de este trayecto, por comprender los tiempos de mi ausencia y festejar cada momento que compartimos. A **Alejandro Almaguer** por su cariño en todo momento, por acompañarme durante este tiempo y siempre brindarme palabras de aliento y positividad.

A la **Dra. Lizeth Alicia Fuentes Mera** por su ingenio, su paciencia y dedicación a lo largo de este proyecto, por brindarme las herramientas y conocimientos necesarios para llevar a cabo este trabajo.

Al **Dr. Jorge Ocampo Candiani** y a la **Dra. Herminia Martínez** por el apoyo y su asesoría, por brindarme la motivación necesaria y su confianza en mí.

A la **M.C. María Lara Banda** por su disponibilidad a lo largo de los experimentos y al **M.C. Víktor Romero Díaz** por sus consejos y su asesoría.

A mis compañeros de Laboratorio **Alex, Nidia, Vanessa y Mayra**. A mis compañeros Residentes Dermatólogos **Ángel Guerra, César Ramos, Ana Karen Lozano, Sonia Ocampo, Karla Paz** y demás compañeros.

Al **Dr. Rogelio Treviño** y la **Dra. Gloria González** por ser una fuente de inspiración, por guiarme y brindarme siempre palabras de aliento a lo largo de este trayecto. A **Yessenia** y todo el Departamento de Posgrado.

A la **Dra. Ana María Rivas** por permitirme desarrollarme dentro del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular. A todos los Profesores del Departamento y personal administrativo **Vicky, Juany, Ari y Lily**.

A **CONAYCT** por el apoyo económico brindado y de manutención durante el posgrado.

A todas las personas que fueron partícipes de este trabajo y que saben los aprecio.

DEDICATORIA

A **mi familia**, quienes son mi motivación para seguir adelante en el camino de la ciencia.

A todos aquellos que lean este trabajo, deseando que contribuya en ampliar sus conocimientos.

“Para las personas creyentes, Dios está al principio, para los científicos está al final de todas sus reflexiones”

Max Planck

TABLA DE CONTENIDO

LISTA DE TABLAS	I
LISTA DE FIGURAS	II
LISTA DE FIGURAS	IV
RESUMEN	1
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN	2
CAPÍTULO II. ANTECEDENTES	4
2.1 MEDICINA REGENERATIVA	
2.2 BIOMATERIALES	
2.2.1 CATEGORÍAS DE BIOMATERIALES	
2.2.2 ESTRUCTURAS DE BIOMATERIALES	
2.2.2.1 HIDROGELES	
2.2.2.2 EL ÁCIDO ALGÍNICO COMO MEDIO DE ANDAMIAJE CELULAR	
2.3 BIOFUNCIONALIZACIÓN	
2.4 FACTORES DE CRECIMIENTO	
2.4.1 FACTOR DE CRECIMIENTO ENDOTELIAL VASCULAR	
2.5.1 FRACCIÓN VASCULAR ESTROMAL	
CAPÍTULO III. JUSTIFICACIÓN	20
CAPÍTULO IV. HIPÓTESIS	21
CAPÍTULO V. OBJETIVOS	22
Objetivo general	
Objetivos específicos	
CAPÍTULO IV. ESTRATEGIA GENERAL	23
CAPÍTULO VII. MATERIAL Y MÉTODOS	25
7.1.1 Cultivo celular	
7.1.2 Elaboración de implantes	
7.1.3 Microscopía electrónica de barrido.	
7.2 Equipos	
CAPÍTULO VIII. RESULTADOS	37
8.1.1 Aislamiento celular	

- 8.1.2 Evaluación del potencial multilinaje y troncalidad de las células de la SVF
- 8.2 Determinación de la concentración de alginato que genere una ultraestructura con un tamaño de poro que permita la proliferación celular
 - 8.2.1 Elaboración de los implantes de alginato a las concentraciones de 2, 4 y 6%
 - 8.2.2 Determinación de la concentración de alginato que promueva la proliferación celular.
 - 8.2.3 Análisis por microscopía electrónica de barrido.
- 8.3 Definición de la concentración de VEGF que permita una mayor proliferación celular.

CAPÍTULO IX. DISCUSIÓN. 55

- 9.1 Aislamiento celular
- 9.2. Desarrollo del implante
 - 9.2.1 Ensayo de proliferación celular
 - 9.2.2 Análisis de la ultramicroestructura de los implantes mediante SEM

CAPÍTULO X. CONCLUSIONES 61

CAPÍTULO XI. PERSPECTIVAS 62

ANEXO I. PREMIOS Y CONGRESOS 63

CAPÍTULO XII. BIBLIOGRAFÍA 65

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Polímeros de uso común para aplicaciones biomédicas.

Tabla 2. Frecuencia de los tipos celulares presentes en la SVF.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama general de la estrategia experimental.

Figura 2. Procedimiento simplificado del aislamiento de la grasa.

Figura 3. Distribución de las cajas de cultivo para la diferenciación multilineal.

Figura 4. Esquema general de la preparación del implante para el análisis por microscopía electrónica de barrido.

Figura 5. Cultivo de MSCs observadas al microscopio óptico.

Figura 6. Micrografías de las MSCs de origen porcino.

Figura 7. Micrografías de las MSCs de origen humano.

Figura 8. Diseño de los implantes de alginato en hidrogel a la concentración de 2,4 y 6%.

Figura 9. Ensayo de proliferación por el método de Azul Alamar de la línea celular de MSCs y fibroblastos 3T3 embebidas en los implantes 3D de alginato a diferentes concentraciones

Figura 10. Ultramicroestructura del implante de alginato a la concentración de 2% por microscopía electrónica de barrido.

Figura 11. Ultramicroestructura del implante de alginato a la concentración de 4% por microscopía electrónica de barrido.

Figura 12. Ultramicroestructura del implante de alginato a la concentración de 6% por microscopía electrónica de barrido.

Figura 13. Ultramicroestructura del implante de alginato al 2% celularizado con MSCs de origen porcino.

Figura 14. Micrografía del implante de alginato al 4% celularizado con MSCs de origen porcino.

Figura 15. Micrografía del implante de alginato al 6% celularizado con MSCs de origen porcino.

Figura 16. Micrografía del implante de alginato al 2% celularizado con fibroblastos de la línea 3T3.

Figura 17. Micrografía del implante de alginato al 4% celularizado con fibroblastos de la línea 3T3.

Figura 18. Micrografía a 3,000x del implante de alginato al 4% celularizado con fibroblastos de la línea 3T3.

Figura 19. Micrografía del implante de alginato al 6% celularizado con fibroblastos de la línea 3T3.

Figura 20. Espectro de Infrarrojo de las muestras.

Figura 21. Ensayo de proliferación celular por triplicado de los implantes de alginato biofuncionalizados con VEGF.

ABREVIATURAS

ADSC	Células estromales derivadas del tejido adiposo multipotentes
MSCs	Células madre mesenquimales
SD	Desviación estándar
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium
EDC	1-Etil-3-(3-dimetil-aminopropil) carbodiimida
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
SVF	Fracción vascular estromal
g	gramos
H&E	Hematoxilina y Eosina
h	horas
μ	micras
μl	microlitros
SEM	Microscopía electrónica de barrido
ml	mililitros
mm	milímetros
mM	Milimolar
min	minutos
NHS	N-hidroxisuccinimida
ng	nanogramos

RESUMEN

L.B.G Susana Gabriela Cárdenas Ramos

Fecha de Graduación: Julio de 2019

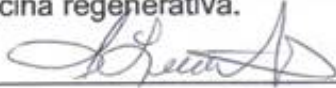
Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Medicina

Candidato para obtener el grado de Maestría en Ciencias con orientación en Biología
Molecular e Ingeniería Genética

Título del estudio: Construcción y caracterización *in vitro* de un sistema de hidrogel bioactivo para el crecimiento de las células de la fracción vascular estromal de tejido adiposo

Área de Estudio: Ingeniería de tejidos

INTRODUCCIÓN: El tejido adiposo proporciona una fuente abundante de células de la fracción vascular estromal (SVF) para la administración inmediata y también puede dar lugar a un número sustancial de células epiteliales y células madre mesenquimales (MSCs). Recientemente, la SVF ha ganado un amplio significado traslacional en la medicina regenerativa. Inicialmente utilizado para el mejoramiento cosmético, este modo de tratamiento ha encontrado uso en muchas enfermedades que involucran afecciones isquémicas, trastornos inmunitarios y degeneración tisular. **OBJETIVO:** Construir y caracterizar *in vitro* un sistema de hidrogel basado en la combinación de alginato biofuncionalizado con VEGF para el crecimiento de las células de la fracción vascular estromal de tejido adiposo. **MÉTODOS:** Se llevó a cabo el aislamiento de la grasa para la obtención de la SVF de origen porcino y humano. Se evaluó el potencial multilineaje y diferenciación de las MSCs presentes en la fracción hacia los linajes adipogénico, osteogénico y condrogénico. Se diseñaron y elaboraron los implantes de alginato al 2, 4 y 6% por triplicado y celularizaron con dos tipos celulares (fibroblastos y MSCs) para evaluar la proliferación celular por el método de Azul Alamar y así determinar la concentración del alginato que sostiene más eficientemente la proliferación celular. Se realizó el análisis de la ultramicroestructura por microscopía electrónica de barrido para determinar el tamaño de poro en los implantes y se evaluó la proliferación celular en presencia de VEGF a concentraciones de 0, 50 y 100ng por triplicado. **RESULTADOS:** Las células tanto de origen porcino como humano estimuladas con los medios de diferenciación resultaron positivas para las tinciones de rojo oleoso, rojo de alizarina y azul Alcian. En el ensayo de proliferación celular, la concentración al 4% de alginato, permitió una tasa de proliferación positiva más alta debido a la presencia de macro poros y micro poros. La concentración de VEGF de 100ng en combinación con el biomaterial y celularizado con la SVF presentó la mayor proliferación celular. **CONCLUSIÓN:** Se generó un implante de tres componentes (alginato, VEGF y SVF) que logró proveer un microambiente favorable para la proliferación, adhesión y distribución de las células, así como la secreción de matriz extracelular, características altamente deseables para la aplicación de implantes en medicina regenerativa.



Dra. C. Lizeth Alicia Fuentes Mera
Director de Tesis

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

El tejido adiposo proporciona una fuente abundante de células de la fracción vascular del estroma (SVF) cuya aplicación puede ser inmediata, así mismo constituye una fuente heterogénea de células que puede dar lugar a un número sustancial de células estromales derivadas del tejido adiposo multipotentes (ADSC). Recientemente, la SVF ha ganado un amplio significado traslacional en la medicina regenerativa [1].

Inicialmente utilizada para el mejoramiento cosmético sobre líneas de expresión y mejora estética mamaria, este modo de tratamiento ha encontrado uso en muchas enfermedades que involucran principalmente afecciones isquémicas, trastornos inmunitarios y degeneración tisular [2].

La terapia celular que utiliza la SVF es una modalidad de tratamiento prometedora, debido a que su composición, involucra a una mezcla de células troncales derivadas de tejido adiposo, células precursoras endoteliales y células moduladoras inmunitarias que actúan sinérgicamente para facilitar la angiogénesis y la diferenciación de las células epiteliales [1,3].

A la fecha la caracterización y utilización de las células de la SVF sigue siendo un área en evolución y con base a estudios recientes, se ha encontrado que su modo de acción potencial se centra en aquellas aplicaciones que dependen de la adecuada angiogénesis.

Si bien hasta el momento las aplicaciones clínicas de la SVF descritas se han desarrollado mediante una aplicación local, esto ha mermado el potencial regenerador de todos sus elementos en la zona de la lesión. Derivado de esto, surge la necesidad de diseñar sistemas de andamiaje que permitan que en especial el

componente celular se sitúa en la zona de la lesión por un periodo de tiempo suficiente para solventar la lesión, de esta forma incidir sobre la adhesión del componente celular y la conservación de los elementos que promueven la angiogénesis [4].

El campo de la ingeniería de tejidos es un campo en evolución, y se están desarrollando y adoptando nuevos procedimientos para generar diversos sistemas de andamiaje para su aplicación en la regeneración de tejidos como el dérmico, óseo, condral, nervioso, entre otros.

El uso de biomateriales con fines regenerativos está ampliamente extendido en el campo de la medicina regenerativa. La aplicación de polímeros sintéticos y naturales comienza a ser frecuente para el tratamiento de las heridas, como sistemas de liberación de fármacos, en injertos vasculares o bien la reconstrucción de tejidos.

El creciente interés por diseñar biomateriales compatibles con el tejido dérmico, es un objetivo relevante de la ingeniería tisular. No obstante, el diseño y evaluación de nuevos biomateriales destinados a estrategias dermorregenerativas requiere una especial atención dada su complejidad.

En este trabajo planteamos la construcción de un implante basado en alginato y biofuncionalizado con VEGF capaz de sostener la adhesión y proliferación de las células presentes en la SVF.

CAPÍTULO II

ANTECEDENTES

2.1 MEDICINA REGENERATIVA

La rama de la medicina que desarrolla métodos para regenerar, reparar o reemplazar células, órganos o tejidos dañados o enfermos es la denominada medicina regenerativa. Incluye el uso de la terapia con células madre, la ingeniería de tejidos y la producción de órganos artificiales [5].

La ingeniería de tejidos, evolucionó desde el campo del desarrollo de biomateriales y se refiere a la práctica de combinar andamios, células y moléculas biológicamente activas en tejidos funcionales. Dicho término se propuso en 1987 durante la reunión de la Fundación Nacional de Ciencias de los Estados Unidos de América [5,6] y su objetivo es ensamblar construcciones funcionales que restauren, mantengan o mejoren tejidos dañados u órganos completos [7].

La piel y el cartílago artificial son ejemplos de tejidos diseñados por esta ciencia que han sido aprobados por la FDA; sin embargo, actualmente tienen un uso clínico limitado en los pacientes [8].

Esta modalidad incorpora investigaciones sobre la autocuración, donde el cuerpo utiliza sus propios sistemas, a veces con ayuda de material biológico biocompatible para recrear células y reconstruir tejidos y órganos. Los términos "ingeniería tisular" y "medicina regenerativa" se han vuelto ampliamente intercambiables, ya que el campo espera centrarse en curas en lugar de tratamientos para enfermedades complejas o a menudo crónicas, como la úlcera venosa y otras afecciones isquémicas.

Las células, son los componentes básicos del tejido y los tejidos son la unidad básica de función en el cuerpo. En general, los grupos de células crean y secretan sus propias estructuras de apoyo, llamada matriz extracelular. Esta matriz, o andamio, no solo da soporte a las células; también actúa como una estación de relevo para varias moléculas de señalización. Por lo tanto, las células reciben mensajes de muchas fuentes que están disponibles en el entorno local. Cada señal puede iniciar una cadena de respuestas que determinan lo que le sucede a la célula. Al comprender cómo las células individuales responden a las señales, como éstas interactúan con su entorno y se organizan en tejidos funcionales, se han podido manipular estos procesos para reparar los tejidos dañados o incluso crear tejidos nuevos [8-10].

Para iniciar, generalmente se empieza con la selección de un biomaterial, que constituirá la base para la generación del andamio o implante a partir de materiales desde los polímeros naturales hasta los sintéticos, dependiendo de la estructura que se requiere tratar. Ya generado el medio de andamiaje celular, éste se puede enriquecer con células y moléculas involucradas con la comunicación intercelular o controladoras del ciclo celular como lo son los factores de crecimiento.

Si se logra imitar el ambiente adecuado para la proliferación, se puede llegar a generar un tejido. Cabe resaltar, que la combinación de estos tres elementos resulta en un abanico de posibilidades para la generación de nuevas alternativas terapéuticas basadas en este campo de estudio. [11,12].

Otra de las alternativas de generación de nuevos tejidos se basa en la utilización de un órgano ya existente. En éste, el proceso de descelularización del “órgano donante” proporciona un andamio de colágeno que sirve como base para el crecimiento del tejido nuevo. Esta alternativa ha tenido un gran impacto en la bioingeniería de los sustitutos de la piel, el corazón, el hígado, los pulmones y el tejido renal [13].

Este enfoque presenta un panorama prometedor que sigue en evolución en la búsqueda de la alternativa idónea, por lo que las futuras aplicaciones médicas van en orden creciente.

2.2 BIOMATERIALES

El campo de los biomateriales ha revolucionado áreas como la bioingeniería y la ingeniería de tejidos para el desarrollo de estrategias novedosas para combatir enfermedades que amenazan la vida. El término biomaterial designa a aquellos materiales utilizados en la fabricación de dispositivos que interactúan con sistemas biológicos y que se aplican en diversas ramas de la medicina [14].

Como se ha mencionado, estas tecnologías se utilizan actualmente para el tratamiento de diferentes enfermedades como las lesiones profundas de piel, la insuficiencia cardíaca, fracturas, etc. Por otro lado, también se tiene la introducción de nanomateriales con el fin de buscar alternativas comercialmente más asequibles [15].

Además de las aplicaciones de este campo en métodos diagnósticos, como lo es el *Lab-on-a-chip*, referente a la implementación de chips sensores aplicados en pacientes para detectar metabolitos relacionados con alguna enfermedad, el área que ha centrado la atención es la fabricación de andamios, los cuales hemos estado mencionado que han mejorado la potencialidad de la ingeniería de tejidos. En la actualidad, el uso de polímeros sintéticos y naturales comienza a ser frecuente para el tratamiento de las heridas, los sistemas de liberación de fármacos, los injertos vasculares o la reconstrucción de tejidos [16-18].

Con respecto al campo de la caracterización de los biomateriales, se ha estudiado cada vez más la relación específica entre las propiedades físico-químicas de los materiales y las proteínas, enzimas o moléculas biológicas; así como en observar

las interacciones y funciones celulares y determinar los parámetros fisiológicos requeridos [18,19]. De allí que las estrategias se orienten hacia un nuevo campo de biomateriales biomiméticos.

El término *biomimético* fue introducido por primera vez en 1957 por el Doctor Otto Schmitt y por tanto, el biomimetismo se define como una disciplina que busca imitar la biología o la naturaleza [20]. En la ingeniería de tejidos, el biomimetismo es de gran importancia, especialmente en el diseño de medios de andamiaje, ya que se puede favorecer la respuesta celular y con esto la formación de tejido nuevo a través de interacciones específicas, potenciando la efectividad de la alternativa terapéutica generada [21]. Un ejemplo de los enfoques más prometedores en el diseño de andamios para la ingeniería de tejidos, consiste en imitar la composición y las propiedades estructurales, morfológicas o mecánicas de la matriz extracelular, con el fin de favorecer el entrono de respuesta celular [22, 23].

Entre las características de los materiales, no puede faltar la de ser biocompatibles o biológicamente aceptables, es decir, que posea la capacidad de apoyar la unión de las células y la migración, la resistencia y su estabilidad estructural. De este modo, en la evaluación de un material, resulta fundamental evaluar su biocompatibilidad y capacidad de reabsorción, ya que permanecen en contacto con los tejidos vivos, por lo que resulta imprescindible que no se produzcan reacciones no deseadas en la interfaz tejido-material y que mantengan sus propiedades durante el tiempo que tengan que desempeñar su función [24].

De igual forma, es importante que el biomaterial constituyente del andamio sea biodegradable, entendiéndose por esto al fenómeno por el cual un material es degradado o solubilizado en agua por cualquier proceso en el cuerpo para eliminarlo desde el sitio implantado [25].

Con el progreso actual respecto a biomateriales, a futuro se espera que las mejores alternativas lleguen al mercado, a un precio cada vez más asequible y se pueda mejorar enormemente el esquema de salud.

2.2.1 CATEGORÍAS DE BIOMATERIALES

Existen categorías para dividir los biomateriales desde la perspectiva clínica que corresponden a: 1) Sintéticos (metales, polímeros, cerámicas y plásticos); 2) Los naturales (los derivados de origen animal y vegetal); y 3) Materiales semisintéticos o híbridos [26].

Todos estos tipos se han estado utilizando en la asistencia clínica desde hace décadas, pero los desarrollos posteriores han mejorado su utilidad. En la Tabla 1 se muestran algunos de los polímeros más utilizados actualmente.

Polímero	Aplicación
Polietileno de alto peso molecular	Rodilla, Cadera, Articulaciones de los hombros, Puentes dentales
Gomas de silicón	Articulaciones
Células/PTFE, células/PET, PET/colágeno, gelatina, ácido hialurónico	Injertos vasculares
Bioglass®/PU, Bioglass®/PS, CF/PS	Columna vertebral, placas, discos, tornillos
PET/PU, PET/colágeno	Prótesis para la pared abdominal
PET/PHEMA, KF/PMA, KF/PE, GF/PU	Tendones y ligamentos
Fibroína de seda	Andamios óseos
Polidimetilsiloxano, poliuretano, PVC	Prótesis faciales
Polimetacrilato de metilo	Cementos óseos

Tabla 1. Polímeros de uso común para aplicaciones biomédicas.

Abreviaturas: PVC, cloruro de polivinilo; PTFE, politetrafluoroetileno; PET, tereftalato de polietileno; PS, polisulfonas; PU, poliuretano; CF, fibras de carbono; PHEMA, poli (2-Hidroxietilo metacrilato); KF, fibras de kevlar; PMA, polimetacrilato; PE, polietileno, GF, fibra de vidrio.

Con respecto a los polímeros de origen natural como el colágeno, la gelatina, el alginato, el ácido hialurónico, etc. se usan ampliamente en la fabricación de andamios tridimensionales (3-D) para apoyar el crecimiento celular y la proliferación. Y como biomateriales de origen natural, su resistencia es especial para tejidos blandos ya que estos andamios en 3D imitan el tejido blando nativo del huésped [27, 28].

2.2.2 ESTRUCTURAS DE BIOMATERIALES

Actualmente, la mayoría de las opciones de andamiaje emergentes se basan en sistemas de hidrogeles y criogeles. Los hidrogeles tienen una gran aplicación en la ingeniería de tejidos blandos y la administración de fármacos. Por su parte los criogeles, caracterizados por presentar en su estructura supermacroporos, permiten la unión y proliferación de la mayoría de los tipos de células de mamíferos y han demostrado su aplicación para ingeniería de tejidos y bioseparación [29,30]. En este estudio hacemos un recorrido por las características y relevancia que presentan los hidrogeles.

2.2.2.1 HIDROGELES

Los hidrogeles son una presentación del biomaterial caracterizada por la presencia de redes poliméricas reticuladas que absorben gran cantidad de agua o cualquier otro fluido biológico sin mostrar ninguna alteración en su arquitectura tridimensional [31]. La retención de agua por los hidrogeles los hace apropiados para diversas aplicaciones biomédicas, ya que todo el sistema tiende a imitar el entorno de la matriz extracelular de los tejidos [32].

Los hidrogeles han evolucionado a partir de implantes estáticos y dispositivos para andamios más dinámicos o vehículos de administración de fármacos. Estos dispositivos dinámicos de hidrogel o implantes, han demostrado tener un gran potencial, como lo es el caso de lentes de contacto que han sido utilizados con éxito para la corrección de la visión y el surgimiento de diseños dinámicos para la administración oftalmológica de fármacos, entre otros.

El ácido hialurónico y el colágeno, están siendo ampliamente explorados para diversas aplicaciones dentro del marco de la ingeniería de tejidos, sin embargo, debido a las limitaciones asociadas con los polímeros naturales, se están desarrollando estrategias para la biofuncionalización de éstos con el fin de hacerlos más adecuados a las aplicaciones biomédicas, sin embargo debe considerarse su accesibilidad ya que estos biomateriales tienen un alto costo [32-34].

Cabe señalar, que para la búsqueda de nuevas alternativas que presenten mayores ventajas y que puedan sustituir a las ya existentes, la caracterización de este tipo de conformación del biomaterial es indispensable.

2.2.2.2 EL ÁCIDO ALGÍNICO COMO MEDIO DE ANDAMIAJE CELULAR

Como ejemplo de un adecuado biomaterial que puede ser utilizado en su forma de hidrogel, se tiene al alginato, el cual es un polisacárido aniónico presente en las paredes celulares de las algas marinas pardas. También es producido por algunas especies bacterianas. Estas sustancias corresponden a polímeros orgánicos derivados del ácido algínico [35].

El alginato requiere el empleo de cationes divalentes gelificantes para formar una estructura en red, la cual permite un medio adecuado para atrapar a las células empleadas y promover la proliferación y la regeneración del tejido. En el caso de implantes dérmicos, el alginato combinado con el calcio como agente entrecruzante,

es una sustancia que, al absorber grandes cantidades de exudado producido por las bacterias en las heridas, proporcionan un ambiente óptimo que favorece la regeneración del tejido con un mínimo o ningún daño al tejido de granulación [36].

Sin embargo, dentro de la literatura hay pocos estudios actuales que caractericen la interacción de este material con los diversos tipos celulares, sin contar los limitados estudios del comportamiento de este biomaterial en presencia de factores de crecimiento.

2.3 BIOFUNCIONALIZACIÓN

Con el fin de mejorar las propiedades superficiales y de interacción de los biomateriales, la biofuncionalización surge como una forma particular de modificación de la superficie de éstos, que implica la inmovilización de biomoléculas como proteínas, péptidos y polisacáridos o fármacos añadidos para tal efecto [37].

Las estrategias actuales utilizadas en la biofuncionalización de los biomateriales incluyen la adición de péptidos o proteínas como es el caso de los factores de crecimiento, que puedan imitar o activar a las proteínas de la matriz extracelular (MEC) u otras biomoléculas solubles naturales, importantes para inducir las complejas interacciones entre las células y la MEC [38].

Se están explorando muchas oportunidades para tratar afecciones mediante la biofuncionalización peptídica de biomateriales que puedan inducir la diferenciación, prevenir infecciones, degradarse a una tasa deseada o incluso como simples desencadenantes del comportamiento celular.

2.4 FACTORES DE CRECIMIENTO

Los factores de crecimiento o GF (de *growth factor*) llamados también "factores tróficos" son un conjunto de sustancias, la mayoría de naturaleza proteica que junto con las hormonas y los neurotransmisores desempeñan una importante función en la comunicación intercelular, capaces de actuar incluso a concentraciones muy bajas. La función principal de los factores de crecimiento es la del control externo del ciclo celular mediante el abandono de la quiescencia celular (G0) y la entrada de la célula en fase G1. El aumento del tamaño celular es estimulado al incrementarse la síntesis proteica [39].

Los factores de crecimiento son sintetizados por un gran número de células, como mediadores celulares ante diversos estímulos, como puede ser una lesión y estos actúan como señales intercelulares de membrana celular. Su mecanismo de acción comienza al unirse a un receptor celular específico que activa a un segundo mensajero en el que interviene una proteína tirosina quinasa y desencadenando una transducción de señal al interior de la célula. Debido a este mecanismo, la acción de los factores en el lugar de la lesión continúa, aunque hayan desaparecido los mismos del medio, ya que han activado el sistema de segundos mensajeros o de forma secuencial una cascada de moléculas [40].

2.4.1 FACTOR DE CRECIMIENTO ENDOTELIAL VASCULAR

Como ejemplo especial para la biofuncionalización de algunos biomateriales inertes se tiene el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), es una proteína señalizadora implicada en la vasculogénesis (formación *de novo* del sistema circulatorio embrionario) y en la angiogénesis (crecimiento de vasos sanguíneos provenientes de vasos preexistentes) [39]. Como su propio nombre indica, las acciones del VEGF han sido estudiadas en las células del endotelio vascular, aunque también tiene efectos sobre otros tipos celulares (por ejemplo, estimula la

migración de monocitos/macrófagos, neuronas, células epiteliales renales). *In vitro*, se ha demostrado que el VEGF estimula la división y la migración de células endoteliales. El VEGF también es un vasodilatador e incrementa la permeabilidad vascular; originalmente recibía el nombre de factor de permeabilidad vascular (vascular permeability factor) [40].

Es secretado por muchas células de la mesénquima y del estroma, induce la migración de células precursoras endoteliales a partir de la médula ósea, y estimula la proliferación y diferenciación de estas células en los sitios de angiogénesis. Cuando la angiogénesis se origina a partir de vasos preexistentes (y no a partir de células precursoras), VEGF estimula la supervivencia de las células endoteliales, su proliferación y su motilidad, iniciando la gemación de nuevos capilares [41].

2.5.1 FRACCIÓN VASCULAR ESTROMAL

Las ADSC se caracterizaron por primera vez en 2001, y desde entonces se han estudiado ampliamente y se han utilizado como una fuente principal de células con potencial regenerativo, con características similares a las MSCs [29]. Las ADSC se aíslan como parte de la fracción acuosa derivada de la digestión enzimática de un lipoaspirado (el producto de la liposucción). Esta fracción acuosa, como se muestra en la Tabla 1, es una mezcla heterogénea formada por una combinación de ADSC, células precursoras endoteliales (EPCs), células endoteliales (EC), fibroblastos, macrófagos, células de músculo liso, linfocitos, pericitos y preadipocitos entre otros, y a esto se le conoce como la SVF.

Tipo celular	Frecuencia %
Células endoteliales	2-4
Células progenitoras endoteliales	7-30
Pericitos	No determinado
Células madre mesenquimales	2-10
Monocitos y células inmunitarias	~ 10
Células TCD4	5-70

Tabla 2. Frecuencia de los tipos celulares presentes en la SVF

Las ADSC, al igual que las MSCs, han demostrado ser prometedoras en la medicina regenerativa y reconstructiva [43,44]. Los avances recientes en el área de la regeneración tisular han puesto a SVF a la par y, en ocasiones, incluso por encima de las ADSC. Por ejemplo, en un estudio de la función eréctil en un modelo de rata de lesión del nervio cavernoso, el tratamiento con SFV mostró resultados estadísticamente significativos superiores en comparación con el tratamiento con ADSC solo, especialmente en la proporción de músculo liso/colágeno y en el contenido de células endoteliales [45]. La ventaja de SVF sobre ADSC se cree que está en dos áreas fundamentales.

En primer lugar, aunque similares en propiedades como la inmunomodulación, antiinflamatorias, angiogénesis, etc., la composición celular heterogénea y distintiva de la SVF puede ser responsable del mejor resultado terapéutico observado en estudios comparativos en animales [46].

En segundo lugar, a diferencia de las ADSC, la SVF se adquiere mucho más fácilmente, sin la necesidad de una separación celular o condiciones de cultivo. Por lo tanto, el producto celular terapéutico se obtiene instantáneamente y tiene un contacto mínimo con los reactivos, lo que lo hace comparativamente más seguro y sujeto al cumplimiento de criterios regulatorios menores. Cabe señalar que, si bien

las ADSC encuentran utilidad tanto en los tratamientos alogénicos como en los autólogos, la SVF, debido a la presencia de varios tipos de células que se sabe que causan rechazo inmunológico, es adecuada solo para los tratamientos autólogos.

A pesar del potencial de la SVF en la medicina regenerativa, hay desafíos que superar. Primero está el aislamiento de la SVF, que necesita una infraestructura especializada, como una sala limpia, equipos, reactivos y capacidades técnicas. Estas condiciones limitan el alcance de la obtención de SVF a solo hospitales importantes en ciudades. En este sentido, los dispositivos biomédicos que pueden tomar lipoaspirado y aislar SVF estéril e inyectable resultarían beneficiosos. En segundo lugar, el método de aislamiento de SVF es un obstáculo vital en el uso aprobado de SVF para aplicaciones terapéuticas. La digestión de lipoaspirado se logra mediante la colagenasa, y la presencia de colagenasa en el producto inyectable no es deseable para las autoridades reguladoras, como la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA) [47]. En consecuencia, se están explorando métodos alternativos con algunos resultados alentadores. Finalmente, la caracterización de las células regenerativas de la SVF no ha alcanzado un amplio consenso. Organizaciones como la Federación Internacional de Terapéutica Adiposa y Ciencia (IFATS) y la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT) han actualizado la definición de células SVF basada en el antígeno de superficie, donde el antígeno CD34, principalmente asociado con las células madre hematopoyéticas se convirtió en un marcador importante de células regenerativas similares a MSC de la SVF [48].

Como se menciona, han surgido problemas con respecto a la falta de directrices regulatorias adecuadas para las terapias que involucran el empleo de esta alternativa de tratamiento y desde la introducción de las directrices preliminares de la Administración de Drogas y Alimentos de los EE. UU. Esto se hizo más público con respecto al uso seguro y eficaz de estas células. Sin embargo, aún es necesaria la exploración de los potenciales de esta terapia por medio de ensayos *in vitro* que permitan caracterizarla y su posterior aplicación en más modelos *in vivo*.

2.6 EL USO DE IMPLANTES CREADOS MEDIANTE INGENIERÍA DE TISULAR.

Entre los órganos creados mediante ingeniería tisular, la piel fue el primer órgano que pasó de la investigación al cuidado del paciente. La ingeniería de los implantes o sustitutos biológicos de la piel ha progresado a lo largo del tiempo desde las aplicaciones individuales de las células residentes de la piel como queratinocitos y fibroblastos [49], los implantes de biopolímeros [50], hasta las combinaciones de células y biomateriales para el tratamiento, la curación y el cierre de las heridas agudas y crónicas de la piel que involucran procesos de reepitelización y neovascularización.

Los sustitutos de la piel pueden clasificarse en tres grupos: andamios acelulares, sustitutos temporales que contienen células de la piel alogénicas y sustitutos permanentes que contienen células autólogas de la piel. El uso combinado de sustitutos dérmicos acelulares con sustitutos permanentes de la piel que contienen células autólogas ha demostrado proporcionar un cierre definitivo de la herida en quemaduras que involucran más del 90% del área de superficie corporal total [51].

Estos avances han contribuido a reducir la morbilidad y la mortalidad por heridas tanto agudas como crónicas, pero hasta la fecha no han logrado reemplazar todas las estructuras y funciones, en este caso de la piel. Entre las deficiencias restantes en los sustitutos celulares o biológicos de la piel están: la ausencia de redes vasculares y linfáticas estables, la ausencia de folículos pilosos, las glándulas sebáceas y sudoríparas y la innervación incompleta.

La corrección de deficiencias, como la vascularización reducida, depende de la regulación de las vías biológicas y cascadas de señalización que involucran el proceso de cicatrización para restaurar la anatomía completa y la fisiología de la piel no lesionada. La elucidación e integración de la biología del desarrollo en futuros modelos de sustitutos biológicos de la piel promete restaurar la anatomía y fisiología completas y reducir aún más la morbilidad por heridas y cicatrices en la piel.

En este ejemplo, la finalidad del tratamiento del paciente con defectos cutáneos es la sustitución de la piel dañada por piel sana lo más rápidamente posible y con los mejores resultados estéticos y funcionales. Esta aseveración es fácil de hacer, pero muy difícil de llevar a cabo ya que las opciones disponibles comercialmente no funcionan de la misma forma en todos los individuos y presentan sus ventajas y desventajas [52].

El método de elección para la cobertura de un defecto cutáneo es el autoinjerto de piel parcial, sin embargo, en determinadas situaciones y/o regiones corporales no sólo es necesario alcanzar una cobertura cutánea estable, sino también, una buena calidad de la piel, y además de la baja disponibilidad de tejido disponible, en algunos casos sus resultados no son adecuados. Los implantes dérmicos son una alternativa de cobertura cutánea, que existen en la actualidad y que permiten obtener mejores resultados funcionales y estéticos [53].

La dermis, constituye la capa de la piel que otorga elasticidad, plegabilidad, textura y consistencia; en la piel dañada, la cantidad remanente de ésta es uno de los mayores responsables de evolución posterior, debido a que la dermis no se regenera. Este es el principal motivo por el cual el desarrollo de implantes tiene tanta importancia [54-56].

Ante una quemadura o herida de espesor completo en áreas especiales o con exposición de tejidos nobles, el uso de autoinjertos de piel parcial puede permitir la cobertura estable, pero muchas veces, con un déficit funcional y estético importante. Todo debido a la falta de dermis suficiente. En lesiones pequeñas el *Gold standard* para la cobertura de defectos en zona funcionales o estéticas es el autoinjerto de piel total, sin embargo, éste tiene la limitación del tamaño.

Ya que el sustituto ideal no existe, se sabe que el mejor, será el que más se acerque a estas características:

- Protección de la herida frente a infecciones para evitar la pérdida de fluidos.
- Propiedades biológicas que permitan el desarrollo de la neodermis. La estabilidad, la biodegradación e inmuno-compatibilidad [57].
- Permitir la afluencia y proliferación de las células que formarán la “neodermis”. En general, la migración y la función celular están influenciadas por la composición de la matriz de regeneración dérmica, el tamaño del poro y la degradabilidad [58].
- Fácil manipulación y resistencia. El material debe ser capaz de resistir un cierto nivel de fuerzas de cizallamiento, especialmente cuando se aplica sobre áreas difíciles como la espalda, los glúteos, genitales, zonas de pliegue, etc.
- Disponibilidad y costo. El costo es una de las principales razones por las cuales los sustitutos dérmicos no se han masificado. Sin embargo, hay que tener en cuenta la relación costo/beneficio. Muchas veces las alternativas que existen al uso de ciertos sustitutos son más riesgosas y su costo tampoco es bajo [59].

Entre los límites que se encuentran para los sustitutos de la piel disponibles en el mercado están: la reducción de la vascularización, la mala integridad mecánica, la falta de integración, la cicatrización y el rechazo inmunitario. Debido a la incapacidad de revascularizar, las células en el sustituto mueren y se desprenden del tejido huésped. Pocos sustitutos de la piel disponibles comercialmente permiten una vascularización adecuada. Además, el desarrollo de la piel diseñada es un proceso que requiere mucho tiempo y requiere de 2 a 3 semanas de cultivo celular antes de que esté listo para el injerto. Se requieren avances técnicos en los protocolos de cultivo de células y tejidos para superar los problemas de crecimiento celular. Actualmente, los sustitutos de la piel disponibles consisten principalmente en fibroblastos y queratinocitos y, por lo tanto, carecen de la capacidad de hacer

estructuras diferenciadas. Por lo tanto, existe la necesidad de incluir tipos de células adicionales, como las células endoteliales en la piel diseñada. También es necesario reducir el costo de los sustitutos actuales de la piel ya que como ejemplo, el costo para cubrir el 1% del área de la superficie corporal con Epicel™ es de más de 13,000 dólares [60]. Con el fin de satisfacer la gran demanda de sustitutos de la piel de los hospitales para aplicaciones clínicas, es necesario mejorar la producción a gran escala.

Los implantes dérmicos intentan homologar las propiedades de la dermis mediante variadas técnicas de bioingeniería. Pero todos convergen en un mismo fundamento, el cual se basa en el empleo de células de diversas fuentes, el uso de un biomaterial ya sea natural o artificial y el uso de factores de crecimiento ya sea individuales o en combinación [61].

CAPÍTULO III

JUSTIFICACIÓN

En los últimos años se han investigado nuevas aplicaciones del alginato como sistema de andamiaje o vehículo de moléculas bioactivas, así como para el desarrollo de estructuras en ingeniería de tejidos basadas en este polímero. El interés del alginato es consecuencia de sus propiedades intrínsecas como la ausencia de toxicidad, sus características de biocompatibilidad y biodegradabilidad, así como su fácil disponibilidad y precio asequible. Metodológicamente permite mediante métodos sencillos modular la porosidad para mejorar la adhesión de tipos celulares específicos.

Los objetivos de esta tesis van encaminados a la generación de un sistema de andamiaje basado en alginato y biofuncionalizado con el factor vasculogénico VEGF que permita la adhesión celular y el mantenimiento de la proliferación de las células contenidas en la fracción vascular estromal de tejido adiposo. Esto con la perspectiva de potenciales aplicaciones en medicina regenerativa que son dependientes del desarrollo de vasos sanguíneos, como lo son las aplicaciones dermorregenerativas.

CAPÍTULO IV

HIPÓTESIS

El sistema basado en la combinación de alginato en forma de hidrogel, biofuncionalizado con el factor VEGF y embebido con las células de la SVF es capaz de sostener la adhesión y proliferación celular de las células presentes en la fracción vascular estromal de tejido adiposo

CAPÍTULO V

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Construir y caracterizar *in vitro* un sistema de hidrogel basado en la combinación de alginato biofuncionalizado con VEGF para el crecimiento de las células de la fracción vascular estromal de tejido adiposo.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Aislar y caracterizar las células troncales de la SVF de origen humano y porcino y evaluar su troncalidad y potencial multilinaje.
2. Determinar la concentración del alginato que genere una ultraestructura con un tamaño de poro que permita la adhesión y la proliferación celular.
3. Inmovilizar VEGF en el andamio de alginato y evaluar la concentración que sostenga la proliferación de las células de la SVF humana

CAPÍTULO VI

ESTRATEGIA GENERAL

AISLAMIENTO CELULAR

Como fuente celular, se utilizó la SVF ya que es rica no solo en células troncales mesenquimales y fibroblastos, los cuales juegan un papel crucial en la regeneración tisular sino también en células endoteliales capaces de favorecer la vascularización bajo un microambiente propicio. Para la obtención de la SVF se utilizó un procedimiento enzimático. Luego de la liposucción, el tejido graso obtenido fue centrifugado y digerido por 30 minutos a 37°C con Colagenasa tipo I (Collagenase I, GIBCO). Tras la centrifugación, se recuperó la SVF para ser utilizada en el procedimiento de celularización de los implantes.

CONSTRUCCIÓN DEL IMPLANTE BIOACTIVO

Para generar un andamio con un tamaño de poro que permita a las células infiltrarse y proliferar, nosotros propusimos al alginato; este sirvió entonces como soporte para las células de la SVF.

El alginato se trabajó en un formato de hidrogel ya que permite generar estructuras de porosidad controlada y modulable en función de la concentración del biomaterial.

ULTRAMICROESTRUCTURA DEL BIOMATERIAL

Para la caracterización del implante generado se analizó la ultramicroestructura y la porosidad mediante microscopía electrónica de barrido para determinar el tamaño de poro.

Para esto, los implantes fueron fijados con glutaraldehído 12.5%, se llevó a cabo una post-fijación con tetraóxido de osmio 1%, seguido de una deshidratación con acetonas graduales para llevar al punto crítico utilizando CO₂ y el recubrimiento con las nanopartículas de oro para su observación en el microscopio.

BIOFUNCIONALIZACIÓN DEL BIOMATERIAL

Para la biofuncionalización, se acopló químicamente el factor de crecimiento VEGF en 2 concentraciones (50 y 100 ng/ml) y se evaluó su capacidad para sostener la proliferación celular, mediante el ensayo de fluorométrico de Azul de Alamar que mide el metabolismo celular; con una curva de crecimiento durante 7 días.

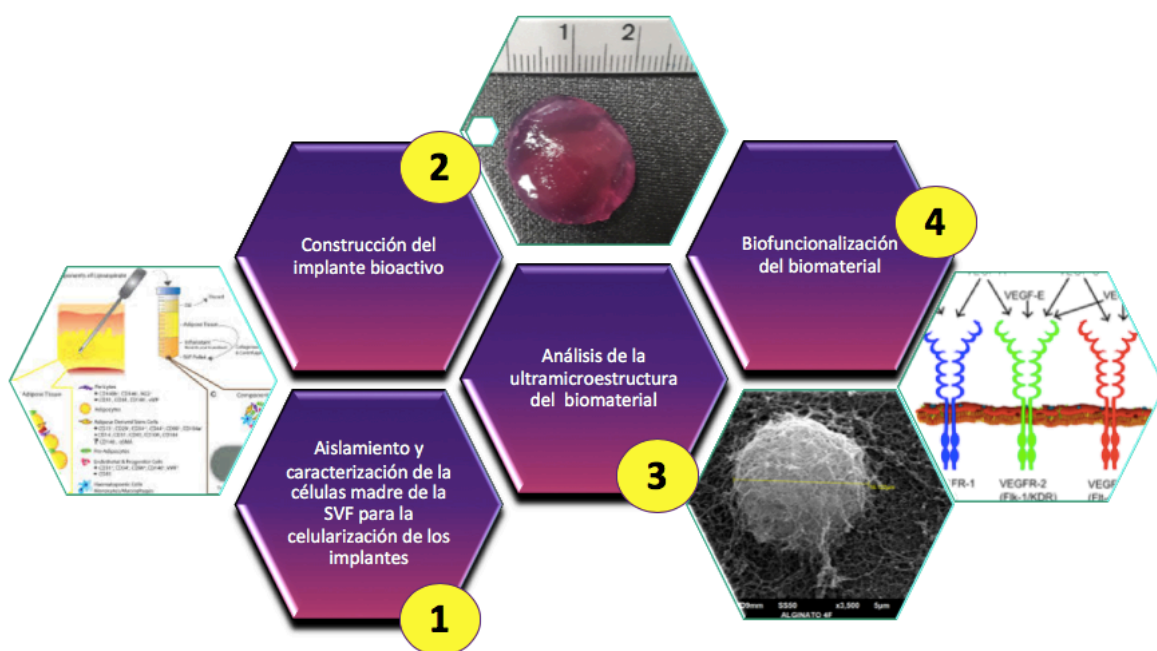


Figura 1. Diagrama general de la estrategia experimental

CAPÍTULO VII

MATERIAL Y MÉTODOS

7.1 MATERIALES Y REACTIVOS

7.1.1 Cultivo celular. Entre los materiales que se utilizaron para el cultivo celular se encuentran botellas de cultivo de 25 cm² (Corning. Costar City, NY), botellas de cultivo de 75 cm² (Corning), botellas de cultivo de 150 cm² (Corning), placas de cultivo fondo plano de 6, 24 y 96 pozos (Corning), pipetas serológicas desechables de 5, 10 y 25 ml (Corning), tubos de plástico de 15 y 50 ml (Corning), tubos para microcentrifuga de 1.5 y 2 ml, criotubos de 1 ml (Corning), puntas para micropipeta de 10, 200 y 1000 µL, unidades de filtración de 500 ml (Corning). Para la extracción de células a partir de grasa se utilizó colagenasa I (GIBCO), PBS (Amresco, Solon OH), cajas Petri (CELLTREAT. SHIRLEY, MA).

Para el cultivo de las células de la SVF mantenidas sin diferenciar se utilizó el medio DMEM (Dulbecco's Modification of Eagle's, num. cat. 15-013-CVR, Corning. Mediatech, Inc. EE.UU.) suplementado con suero fetal bovino (HYCLONE), tripsina al 0.25% (Invitrogen), antibiótico-antimicótico 100X (GIBCO-BRL. Grand Island, NY), L- glutamina 200 mM 100X (GIBCO). Para las MSCs diferenciadas al linaje condrogénico se utilizó el medio DMEM suplementado (Dulbecco's Modification of Eagle's, num. cat. 15-013-CVR, Corning. Mediatech, Inc. EE.UU.), además de los reactivos anteriores, con ácido linoleico (num. cat. 013-19641, Wako. Japón), ácido L-ascórbico (num. cat. 013-19641,27). Para la diferenciación al linaje adipogénico se utilizó el medio DMEM suplementado (Dulbecco's Modification of Eagle's, num. cat. 15-013-CVR, Corning. Mediatech, Inc. EE.UU.) además de Dexametasona ≥98% (HPLC), CAS Num: 50-02-2. Para la diferenciación al linaje osteogénico, medio DMEM suplementado (Dulbecco's Modification of Eagle's, num. cat. 15-013-CVR, Corning. Mediatech, Inc. EE.UU.), mas beta-glicerol, Dexametasona ≥98% (HPLC), CAS Num: 50-02-2 y ácido ascórbico (L-Ascorbic acid 99%; SIGMA, CAS Num: 50-81-7).

7.1.2 Elaboración de implantes, biofuncionalización y ensayos de viabilidad celular. Se utilizaron jeringas de plástico (1 ml, 27Gx13 mm, DL MÉDICA, S.A. de C.V. México), alginato (num. cat. A-2158, SIGMA), cloruro de calcio (C-7902, SIGMA), medio DMEM suplementado (Dulbecco's Modification of Eagle's, num. cat. 15-013-CVR, Corning. Mediatech, Inc. EE.UU.), agitadores magnéticos, papel filtro whatman (SIGMA-ALDRICH). Para la biofuncionalización se utilizó VEGF (SIGMA-ALDRICH V-7259), EDC/NHS 1-Etil-3-(3-dimetil-aminopropil) carbodiimida/N-hidroxisuccinimida. Para medir la viabilidad de las células en el implante se utilizó Azul Alamar (abD Serotec®) y placas de 12 pozos (Corning).

7.1.3 Microscopía electrónica de barrido. Se utilizó glutaraldehído 12.5% como fijador (25% EM SCIENCE. Alemania), tetraóxido de osmio (cat. 18456, TED PELLA Inc.), acetona (CTR), dióxido de carbono (Praxair), sistema de recubrimiento de oro (SCD 040, Balzers union), secador de punto crítico (CPD 020 Balzers union), bomba eléctrica (LR 13758 doer) y cámaras de vacío.

7.2 Equipos

- Campana de flujo laminar (Labconco Class II type A2. México D.F., México).
- Sistema de multi-detección GloMax® (Promega).
- Incubadora de CO₂ Series 8000 WJ (Thermo Scientific. México D.F., México)
- Potenciómetro SevenMull (METTLER TOLEDO).
- Microtomo RM2235 (Leica. Buffalo Grove, IL).
- Microscopio PALM Microimaging GmbH (Carl Zeiss. México D.F., México)
- Termociclador GeneAmp 2400 (Perkin Elmer).
- Termociclador C1000 y sistema tiempo real CFX96 (BIO RAD).
- Lector de imágenes Cytation 3 (BioTek).
- Espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific).
- Microcentrífuga 5424 (Eppendorf).
- Incubadora MaxQ 4000 (Thermo Scientific).
- Mezclador Vortex-Genie®2 (Scientific Industries, Inc. EE.UU.).
- Cabina P-030-202 (C.B.S. Scientific).

- Centrífuga IEC CL10 (Thermo Scientific).
- Citómetro de flujo (Attune, Applied Biosystem)
- Balanza GX-2000 (AND).
- Placa de calentamiento/agitación CIMAREC SP131325 (Thermo Scientific)
- Microscopio electrónico de barrido JSM-6510LV (JEOL)
- Baño de flotación
- Baño de inclusión
- Secador de punto crítico CPD 020 (Balzers)
- Recubridor de oro (SCD 040, Balzers union)
- Sonicador (SCD 040, Balzers union)

7.3 METODOLOGÍA

Objetivo 1. Aislar y caracterizar las células madre de la SVF de origen humano y porcino y evaluar su troncalidad y potencial multilinaje.

7.3.2 Aislamiento celular

Con el fin de analizar no solo la SVF de origen humano, sino también la de un modelo animal para futuros ensayos *in vivo*, se seleccionó un modelo porcino al cual se le practicó una lipectomía.

La grasa extraída del lomo de un cerdo fue cortada en fragmentos pequeños sobre una placa de Petri con ayuda de bisturí y pinzas. Este tejido se lavó con buffer PBS más antibiótico-antimicótico hasta eliminar la mayor cantidad posible de sangre y posteriormente se colocó en un recipiente de plástico estéril que contenía un agitador magnético y 10 ml de colagenasa I al 0.1%, se colocó en agitación de 1 a 2 horas dependiendo de la consistencia y cantidad del tejido. Posteriormente se agregaron 2 volúmenes de PBS, se agitó un poco y se esperó a que se formaran dos fases, una de grasa y adipocitos en la parte superior, y otra en la parte inferior donde se encontraban la SVF. El infranadante fue recuperado y colocado en tubos

falcon de 15 ml, estos fueron centrifugados a 2000 rpm por 6 min, se decantó el sobrenadante y la pastilla se lavó por centrifugación una vez más con PBS, finalmente se resuspendió en medio para células troncales, que consiste en medio DMEM adicionado con 5% de L-glutamina. Se agrega suero fetal bovino para que quede a una concentración del 10%. Se añade antibiótico/antimicótico (penicilina/estreptomicina) 1% para ser sembradas e incubadas a 37°C y 5% de CO₂ en cajas de 25 cm² (fig. 2).

Al segundo día del cultivo se realizó un subcultivo a partir del sobrenadante, este se transfirió a cajas de 75 cm² con el fin de descartar células que no fueran MSCs ya que tipos celulares diferentes, suelen adherirse más tempranamente a las cajas de cultivo. Después de 3 a 5 días se retiró el sobrenadante y se realizó un lavado con PBS para retirar eritrocitos, adipocitos y restos celulares. Se mantuvo con medio para MSCs (DMEM) hasta el segundo pasaje; en el tercer pasaje dependiendo del grupo experimental, se cultivaron con medio para cada linaje ya sea condrogénico, adipogénico u osteogénico.



Figura 2. Procedimiento simplificado del aislamiento de la grasa.

7.3.2.1 Evaluación del potencial multilinaje

A partir de un cultivo de células troncales de origen porcino previamente aislado y llevado a confluencia de un 80% se llevó a cabo la diferenciación durante 14 días para demostrar el potencial multilinaje de dichas células hacia los linajes adipogénico, condrogénico y osteogénico.

Para esto se tripsinizaron las células. La solución de tripsina se neutralizó con igual volumen de medio DMEM suplementado con suero. La suspensión de células se centrifugó a 300 xg durante 10 min y el sobrenadante se descartó. El precipitado se resuspendió en medio DMEM completo y las células se contaron en un hemocitómetro usando azul de tripán. Se sembraron en cajas de 6 pozos 200 mil células por pozo, una caja para cada linaje y su control correspondiente a células mesenquimales de origen humano (fig. 3).

A cada pozo correspondiente se le adicionaron 2ml de cada medio de diferenciación correspondiente y se efectuaba el cambio de medio cada segundo día, hasta completar los 14 días de diferenciación. Transcurrido dicho tiempo se llevaron a cabo las tinciones correspondientes a cada linaje y el análisis de la morfología celular en un microscopio óptico invertido de la marca Olympus® mod. CKX-40.

Evaluación del potencial multilínea

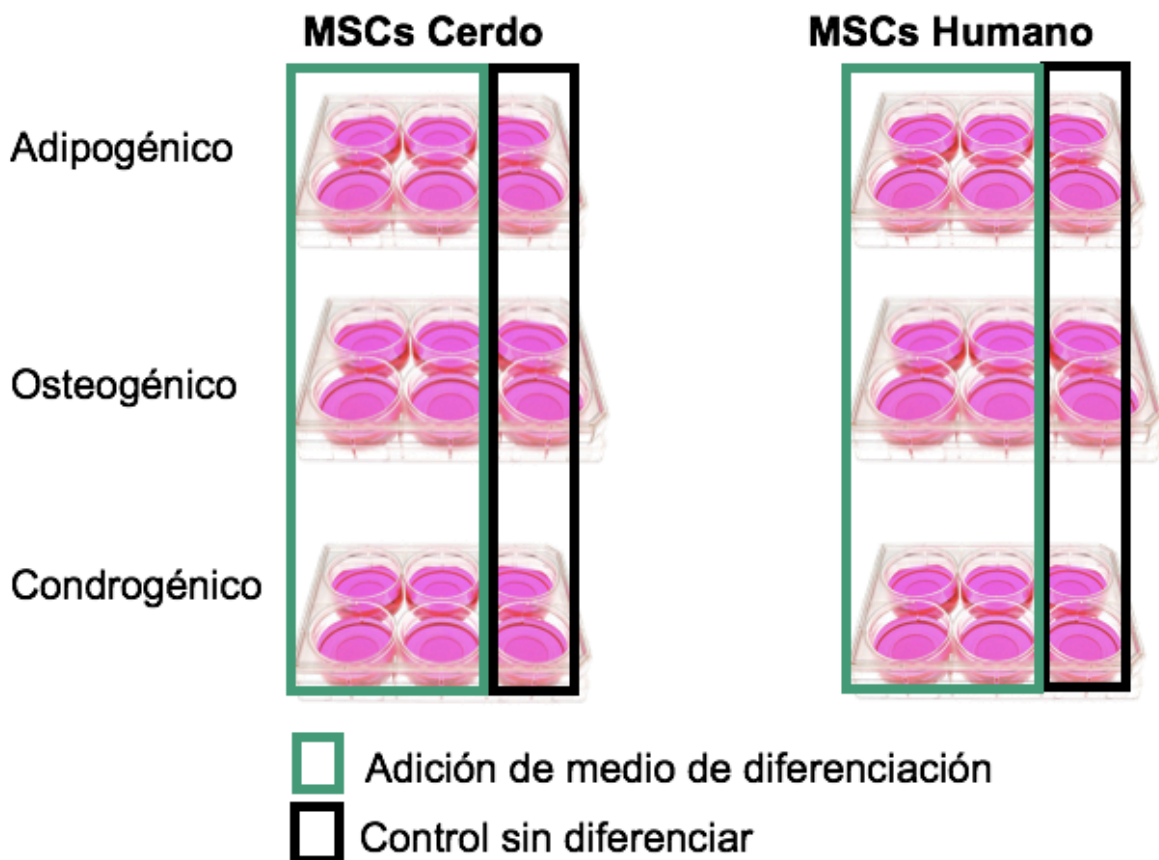


Figura 3. Distribución de las cajas de cultivo para la diferenciación multilínea

Medio adipogénico

Para llevar a cabo la inducción de la diferenciación de las células hacia el linaje adipogénico, tomando como base el medio DMEM suplementado, se adicionaron los siguientes reactivos para tener una concentración final de: ITS 1.02 µg/ml, Dexametasona 1.02 µg/ml e IBMX 1.0 µg/ml.

Al cabo de 14 días se llevó a cabo la tinción de rojo oleoso. Se fijaron las células en los pozos con 2 ml formalina al 10% por 15 min, se hizo un lavado con agua destilada y se agregó 2 ml del colorante rojo oleoso durante 2 h. Se lavó por 4 veces con agua destilada y se observó al microscopio óptico para el análisis morfológico.

Medio condrogénico

Tomando como base el medio DMEM, sin la adición de suero bovino fetal, se suplementó con los siguientes reactivos para tener una concentración final de: ITS 1.0 µg/ml, Dexametasona 1.0 µg/ml, TGF-beta 0.1 µg/ml, L-ascórbico 50 µg/ml, L-prolina 40 µg/ml, y L-glutamina 5%. Finalmente se filtró y se almacenó a 4°C.

De igual forma, al cabo de 14 días se efectuó la tinción Azul Alcian, fijando las células con etanol al 70% durante toda la noche. Se hizo un lavado con agua destilada, se añadió 1 ml de ácido acético al 3% por 15 min, se lavó con alcohol-ácido al 1% en etanol absoluto y se realizaron tres lavados con agua destilada. Se observó al microscopio para el análisis morfológico.

Medio osteogénico

Se empleó medio DMEM suplementado con los siguientes reactivos para tener una concentración final de: Dexametasona 1.02 µg/ml, β-Glicerol Fosfato 1.0 µg/ml, L-ascórbico 50 µg/ml. Se filtró y se almacenó a 4°C.

Se realizó la tinción de Rojo de alizarina S, donde las células se fijaron con formalina al 10% por 15 minutos, ésta se retiró y posteriormente se añadieron 2 ml del colorante rojo de alizarina S, se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos, se hicieron cuatro lavados con agua destilada y se procedió al análisis morfológico mediante microscopía óptica.

Objetivo 2: Determinar la concentración del alginato que genere una ultraestructura con un tamaño de poro que permita la adhesión y la proliferación celular.

7.3.3 Ensayo de proliferación

Se realizó un ensayo de proliferación con dos líneas celulares; la línea 3T3 de fibroblastos de ratón, así como con un cultivo de células troncales mesenquimales de origen porcino siguiendo el mismo procedimiento que se menciona a continuación.

A partir de un cultivo de fibroblastos de la línea 3T3 y otro cultivo correspondiente a MSCs entre los pasajes 3-4 se combinó con la concentración del alginato correspondiente al 2, 4 y 6% cada una por triplicado, celularizados con 1×10^6 células y un grupo control sin celularizar.

Se realizaron andamios de 2 cm de diámetro y 5mm de espesor con ayuda de una placa de 12 pozos Corning® estéril como molde, procediendo a la gelificación durante 1 hora con cloruro de calcio al 0.102 M por goteo, colocando papel filtro whatman en el fondo del pozo, seguido del alginato, un segundo papel filtro y por goteo se administró el cloruro de calcio como lo indica la técnica de *Galateanu y Col.s.* que permite una gelificación más uniforme ya que el cloruro de calcio penetra gradualmente dentro del biomaterial, procediendo a la incubación al 5% de CO₂ a 37°C. Para esto cada implante ya solidificado se pasó a otro pozo individual de una placa de 6 pozos y se administró 5ml de medio DMEM suplementado y se dejó en incubación a las condiciones mencionadas por 24 horas.

Para el ensayo de proliferación celular se partió de la adición de Azul Alamar al 10% disuelto en medio DMEM, se colocaron los andamios celularizados de los grupos de alginato al 2%, 4% y 6%, y su triplicado en una placa de 6 pozos, cada andamio en un pozo diferente, un pozo con el control en monocapa y un control de alginato sin células. Se agregó 5 ml del Azul Alamar al 10% seguido por incubación por 5h en CO₂ a 37°C de cada grupo experimental y la lectura de la fluorescencia a un rango de excitación a 530-560 nm y una emisión a 590 nm en un lector de placas GloMax a los días del 1 al 10 y se graficaron los resultados mediante el software *prism 7*.

Al finalizar el ensayo de proliferación, se tomó uno de los implantes de alginato al 2% para su análisis morfológico con la tinción de H&E. Para esto, se fijó el implante con formaldehído al 10% durante 12 h, se colocó en el medio de inclusión O.C.T Tissue-Tek® (Bio-optica) y se llevó a congelación por 2 h. Transcurrido este tiempo se realizaron los cortes con ayuda de un criostato LupeTecCM2850 y los cortes se tiñeron con Hematoxilina & Eosina (H&E)..

7.3.3.1 Microscopía electrónica de barrido: Los implantes generados fueron fijados con glutaraldehído 12.5% por 14 h. Posteriormente se realizó una post-fijación con tetraóxido de osmio 1% por 1 h en campana de humos. Las muestras se deshidrataron con dos cambios de acetonas en las siguientes concentraciones: 35, 50, 70, 96 y 100% por 15 minutos cada uno, finalmente se llevaron a punto crítico utilizando CO₂ y se recubrieron con oro, utilizando un espesor de 15 nm. Las muestras se conservaron en vacío para evitar la humedad hasta su análisis para determinar el tamaño de poro en un microscopio electrónico de barrido de la marca JEOL Series JSM-6490LV (fig. 4).

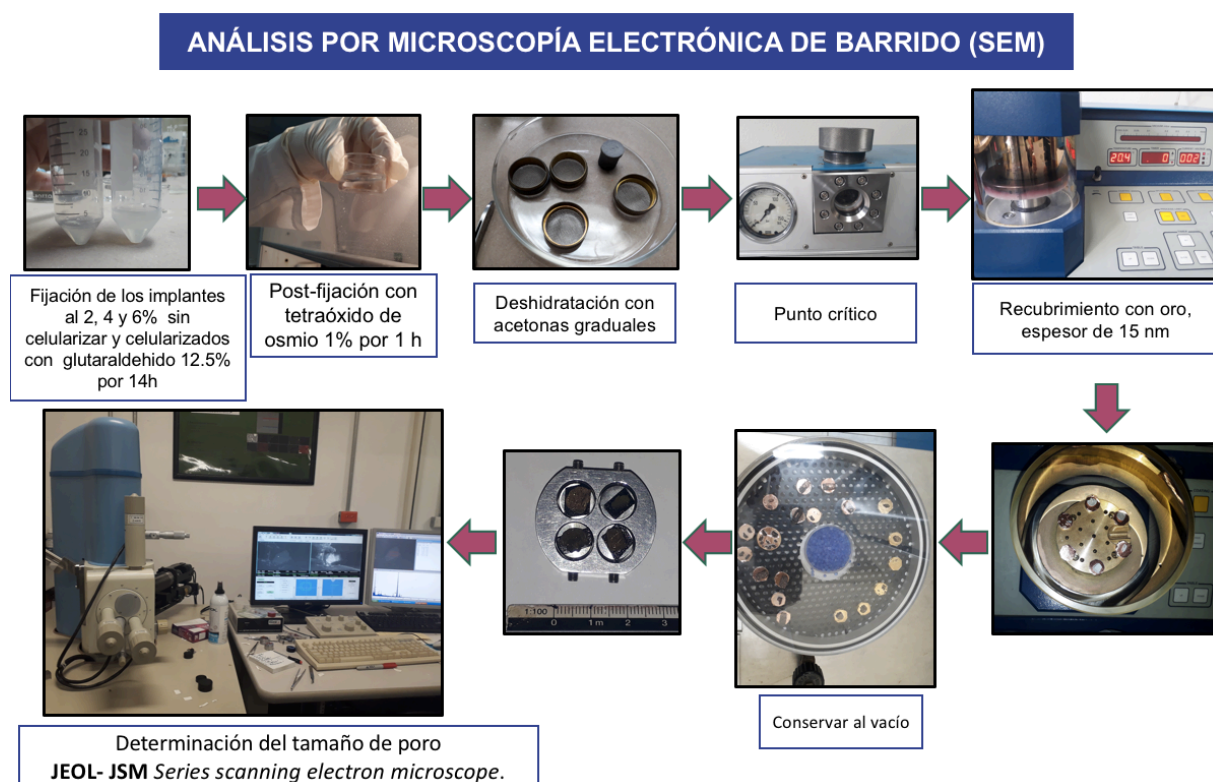


Figura 4. Esquema general de la preparación del implante para el análisis por microscopía electrónica de barrido.

Objetivo 3. Inmovilizar el VEGF en el andamio de alginato y evaluar la concentración que sostenga la proliferación de las células de la SVF humana

7.3.4 Determinación de la concentración de VEGF. Se partió de las concentraciones de 0,50 y 100 ng/ml de VEGF para la biofuncionalización de los implantes de alginato, la cual consiste en la unión de ambas moléculas vía la reacción química en la cual el VEGF se conjugó con el alginato mediante la reacción de 1-etil-3-(3-dimetil-aminopropil)carbodiimida/N-hidroxisuccinimida (EDC /NHS) (fig.6). Se agregó al alginato disuelto en medio DMEM, 1mg de EDC y 0.4 mg de NHS por cada microgramo de alginato y se hizo reaccionar durante 2 h en el baño con hielo a un pH = 5-6. Después de la activación del alginato por EDC, se añadió VEGF (concentración =50 y 100ng/ml) a la solución y se hizo reaccionar durante 12 h a temperatura ambiente a un pH = 8.5.

7.3.4.1 Espectroscopia de infrarrojo (IR). Para verificar que la reacción de conjugación se haya llevado a cabo, se procedió a realizar lecturas por espectroscopia infrarroja, analizando un implante de alginato control, sin VEGF y los implantes con el factor.

Para esto, se procedió a elaborar los implantes de alginato al 4% control y en combinación con el VEGF a las concentraciones de 50ng/ml y otro implante a la concentración de 100ng/ml del factor. Se gelificaron con el CaCl_2 tal como se describió anteriormente, se llevaron a congelación a -80°C toda la noche y se liofilizaron las muestras para finalmente someterlas al equipo de lectura de IR en un Espectrofotómetro de Infrarrojo por Transformada de Fourier (FT-IR) (Thermo Scientific Modelo Nicolet iS10) para registrar los espectros de IR en un

Espectrofotómetro de Infrarrojo por Transformada de Fourier (FT-IR) (Thermo Scientific Modelo Nicolet iS10)

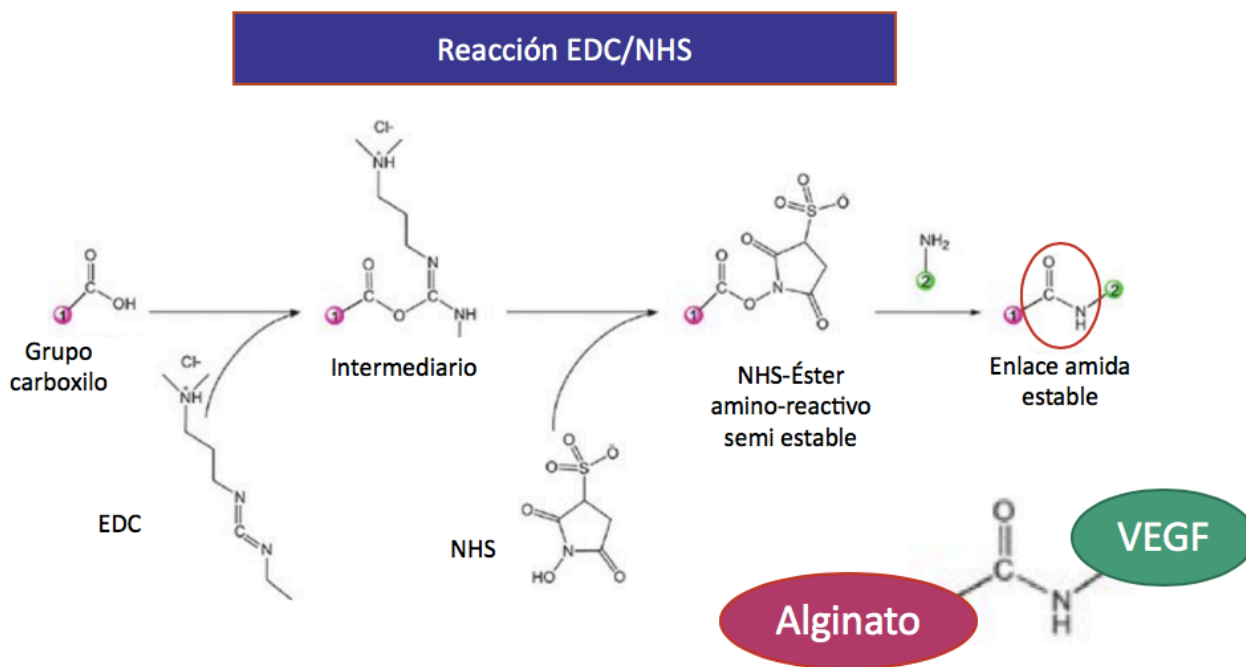


Figura 6. Representación esquemática de la reacción EDC/NHS. El EDC reacciona con el grupo carboxilo de una primera molécula formando un intermediario aminoreactivo. Este intermediario puede reaccionar con el grupo amino de otra molécula produciendo un conjugado de las dos moléculas unidas por un enlace amida estable. La adición de NHS estabiliza el intermediario y aumentar la eficiencia de las reacciones de acoplamiento mediadas por EDC.

Para medir la proliferación celular de los implantes de alginato a las diferentes concentraciones de VEGF, fueron celularizados con 5×10^5 células y se efectuó un ensayo de proliferación por el método de Azul alamar mencionado anteriormente a los días del 1 al 7.

CAPÍTULO VIII RESULTADOS

8.1 1. Aislamiento y caracterización de las células troncales de la SVF de origen humano y porcino y evaluación de la troncalidad y potencial multilineaje.

8.1.1 Aislamiento y caracterización de las células troncales de la SVF de origen humano y porcino

Con el fin de aislar las MSCs se procedió a realizar un subcultivo de la SVF obtenida, con la finalidad de descartar cualquier otro tipo celular presente en la muestra; esto en apego a los criterios establecidos por la International Society for Cellular Therapy (ISCT) que establece que las poblaciones celulares con capacidad de adherencia al plástico en las cajas de cultivo presentan un fenotipo mesenquimal a diferencia de los otros tipos celulares que carecen de esta.

A partir de 4g de grasa tomada de la región lumbar del cerdo, se aislaron las MSCs mediante digestión enzimática; mostrando un adecuado crecimiento celular que permitió alcanzar al quinto día de cultivo una confluencia del 80% en botella de 25 cm². Por otro lado, las MSCs de origen humano fueron aisladas a partir de 100 ml de lipoaspirado estableciendo un cultivo confluyente (80%) al día 7 de cultivo en botella de 25 cm². Ambos cultivos, de cerdo y humano, mostraron una morfología característica fibroblastoide y alargada con un núcleo central tal como se ilustra en la figura 5.

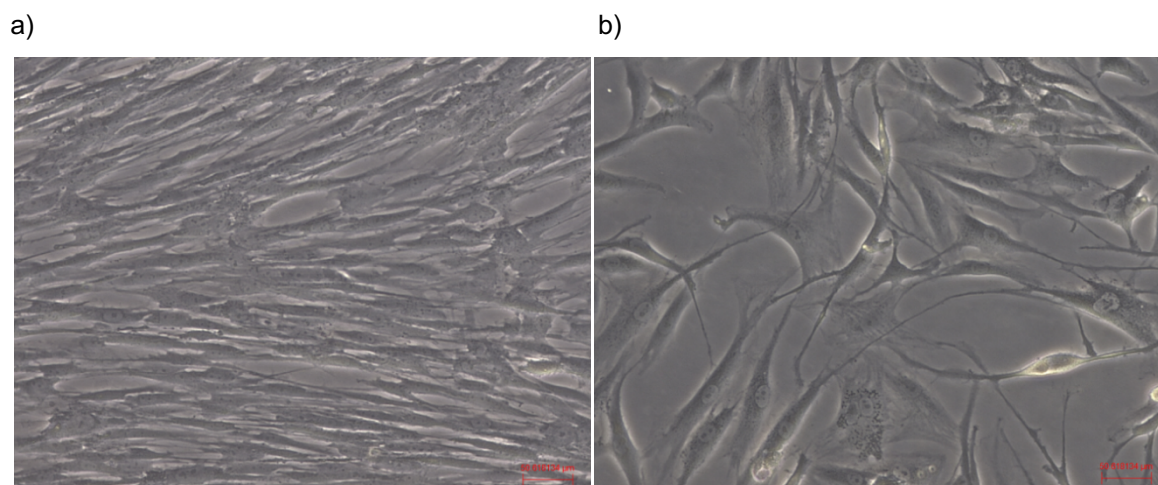


Figura 5. Cultivo de MSCs observadas al microscopio óptico a 10x. a) MSCs de origen porcino. b) MSCs de origen humano.

8.1.2 Evaluación del potencial multilinaje de las células madre de la SVF de origen humano y porcino.

La capacidad de diferenciación hacia otros tipos celulares es una propiedad intrínseca que define a las MSCs. En este trabajo como punto de control hemos comprobado que las células aisladas mediante digestión enzimática con colagenasa I a partir de lipectomia de cerdo y lipoaspirado de humano conservan su capacidad multipotente entre los pasajes utilizados en estudios posteriores (pasajes del 4 - 6). Ambos cultivos de humano y porcino pueden ser inducidos a diferenciarse, bajo los estímulos descritos en material y métodos hacia el linaje adipogénico, tal como se demuestra por la presencia de gotas lipídicas en color rojo teñidas con rojo Oleoso O. Estas aumentaron de tamaño y al cabo de 14 días de estimulación formaban ya inclusiones lipídicas dentro del citoplasma (fig. 6a, 7a).

Por otro lado, las MSCs de origen porcino y humano estimuladas con el medio condrogénico durante 14 días (fig. 6b, 7b) mostraron la presencia de proteoglicanos en color azul; tal como se demuestra mediante la tinción con Azul de Alcian. Cabe resaltar que en el caso de las MSCs de origen porcino incluso se observó la formación de las condroesferas características de la inducción hacia este linaje,

mientras que las de origen humano solo mostraron la presencia de los proteoglicanos.

Finalmente, las MSCs de ambos orígenes, estimuladas con el medio osteogénico descrito en material y métodos mostraron a los 14 días un cambio en la morfología de alargada fibroblastoide a poligonal así como la presencia de depósitos de calcio; evidenciados en color rojo mediante la tinción con el rojo de alizarina. Con esto se demostró la capacidad de diferenciación hacia el linaje osteoblástico (fig. 6c, 7c).

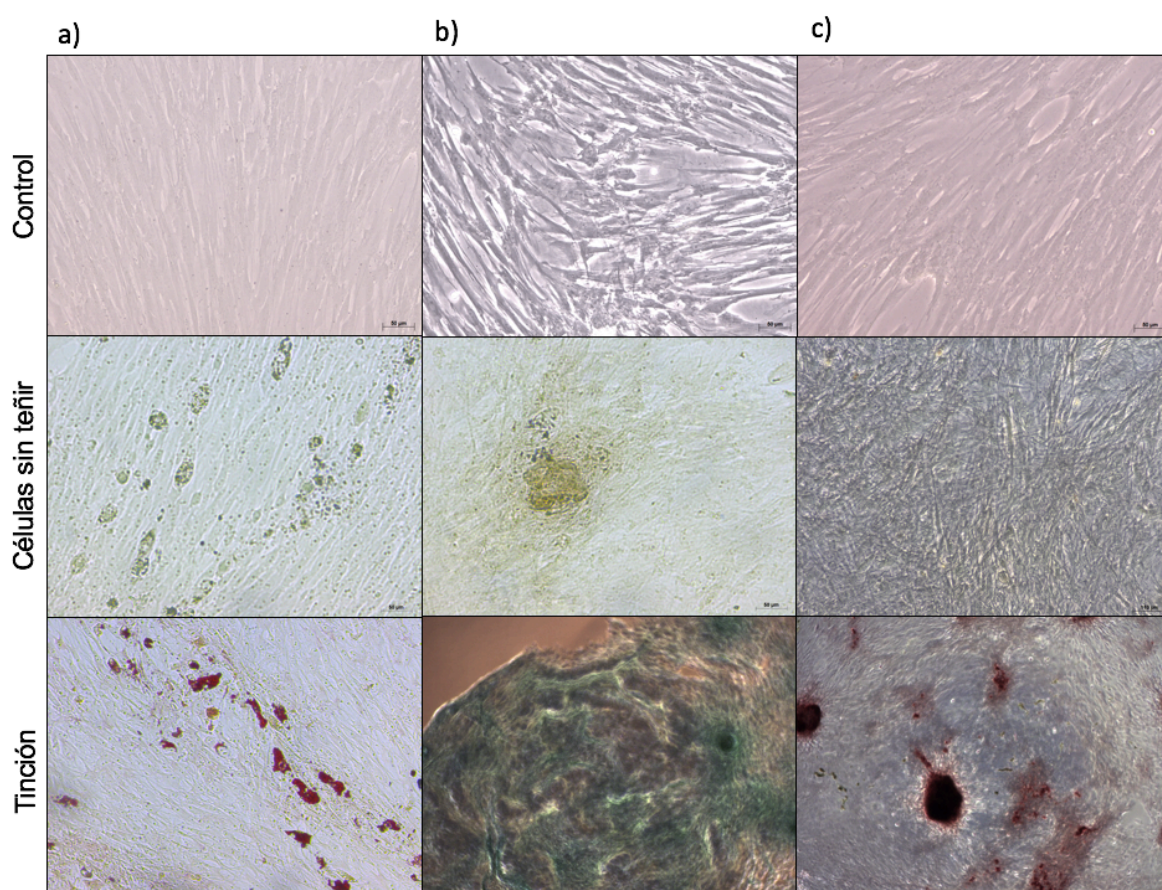


Figura 6. Micrografías de las MSCs de origen porcino. Control en monocapa, células diferenciadas sin teñir y células con la tinción (20x). a) Diferenciación hacia el linaje adipogénico. b) Diferenciación hacia el linaje condrogénico. c) Diferenciación hacia el linaje osteogénico.

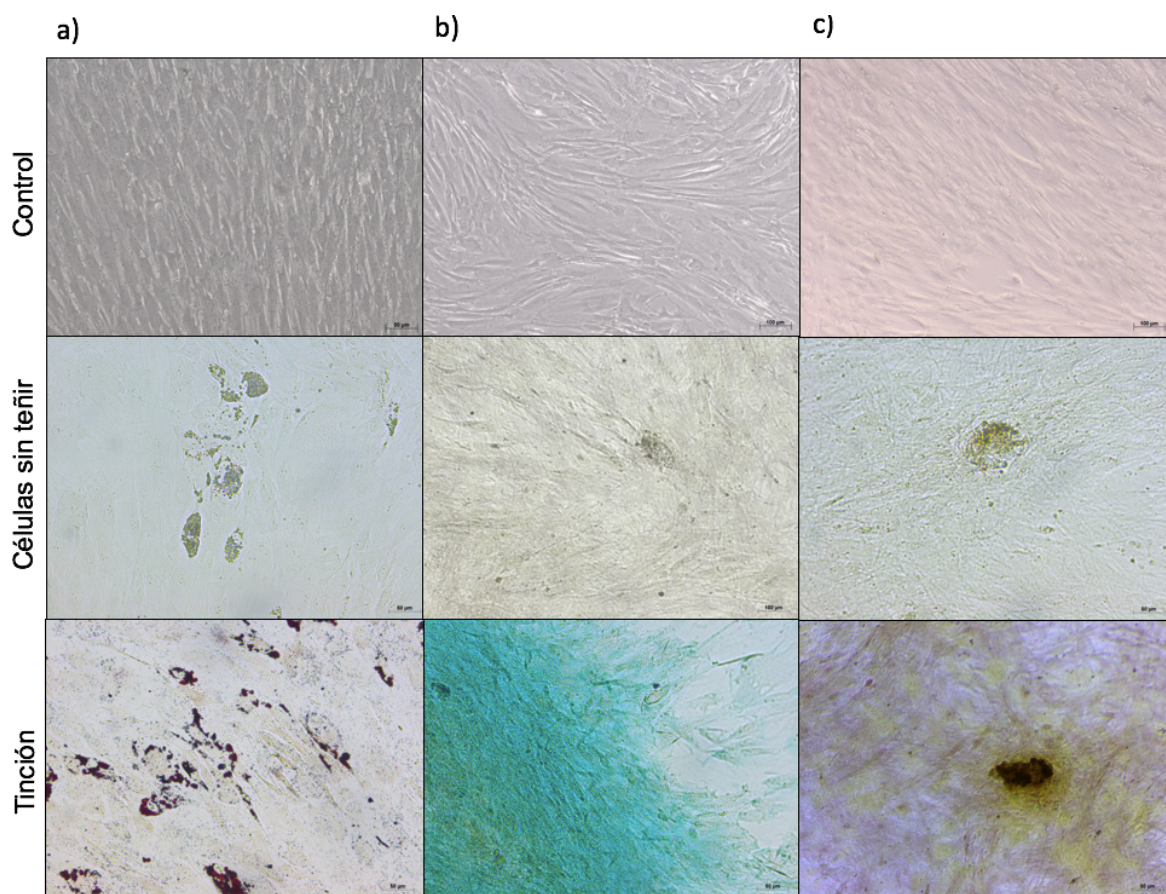


Figura 7. Micrografías de las MSCs de origen humano. Control en monocapa, células diferenciadas sin teñir y células con la tinción (20x). a) Diferenciación hacia el linaje adipogénico. b) Diferenciación hacia el linaje condrogénico. c) Diferenciación hacia el linaje osteogénico.

8.2 Determinación de la concentración de alginato que genere una ultraestructura con un tamaño de poro que permita la proliferación celular.

8.2.1 Generación de los implantes de alginato a las concentraciones de 2, 4 y 6%.

Entre los métodos utilizados para la reticulación del alginato, se encuentra el de gelificación. Esta reticulación se da gracias al intercambio de iones sodio del

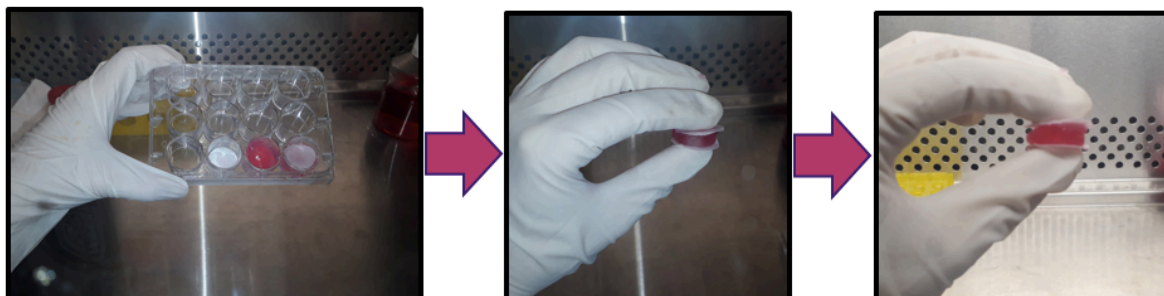
alginato sódico con cationes de calcio, para formar la estructura característica de caja de huevo (fig. 8c). Este método se caracteriza por una rápida gelificación pero también por la obtención de un gel poco homogéneo. Para lograr una gelificación más homogénea se utilizó la técnica de *Galateanu y Cols.* en donde el empleo del papel filtro permitió obtener una gelificación gradual de los implantes, favoreciendo así la estructura uniforme de los mismos (fig. 8a).

Por otro lado para generar un sistema de hidrogel de porosidad controlada se seleccionó por un lado alginato de viscosidad media específicamente entre 80,000 y 120,000 de peso molecular y por otro el control de la concentración del mismo, ensayando los porcentajes de 2, 4 y 6 %.

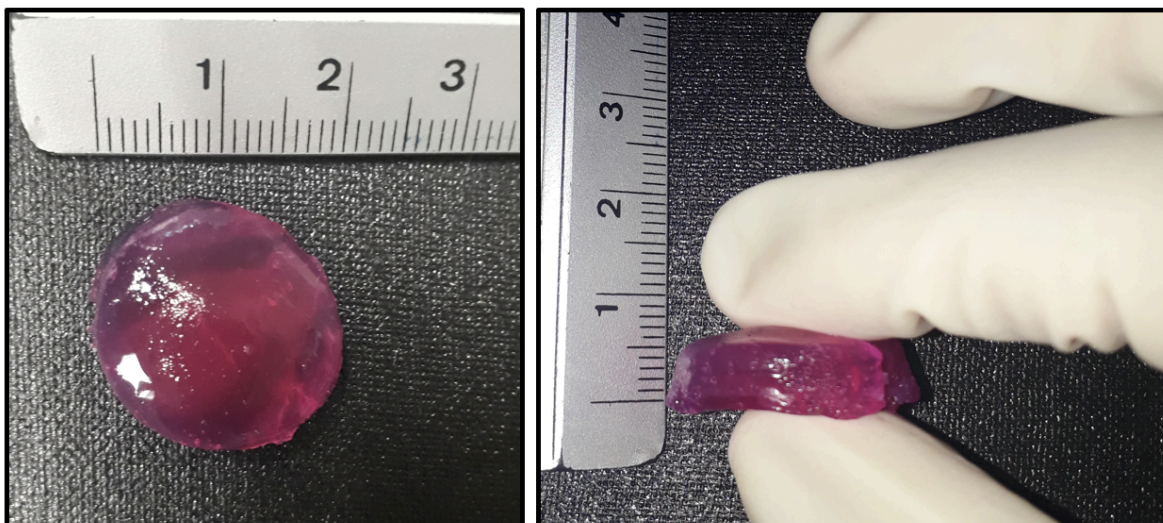
La generación de los implantes de tamaño uniforme se desarrolló tomando como molde los pozos de 2 cm de diámetro de las cajas de cultivo de 12 pozos, con la cual obtuvimos andamios de 2 cm de diámetro por 5 mm de espesor (fig. 8b).

El método aplicado resultó ser reproducible, sencillo y rápido en su procesamiento.

a)



b)



c)

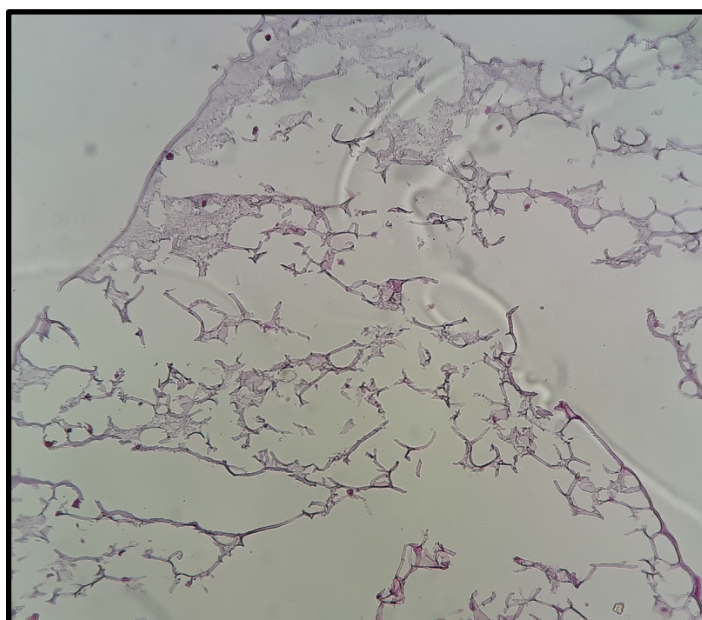


Figura 8. Diseño de los implantes de alginato en hidrogel a la concentración de 2, 4 y 6 %. a) Colocación del papel filtro en la parte inferior del pocillo y en la parte superior de biomaterial para la gelificación. b) Resultado final del diseño del implante de 2 cm de diámetro y 5 mm de espesor. c) Corte por congelación observado a 10x del implante celularizado de alginato al 2 % teñido con la tinción de H&E donde se aprecia la estructura de carton de huevo.

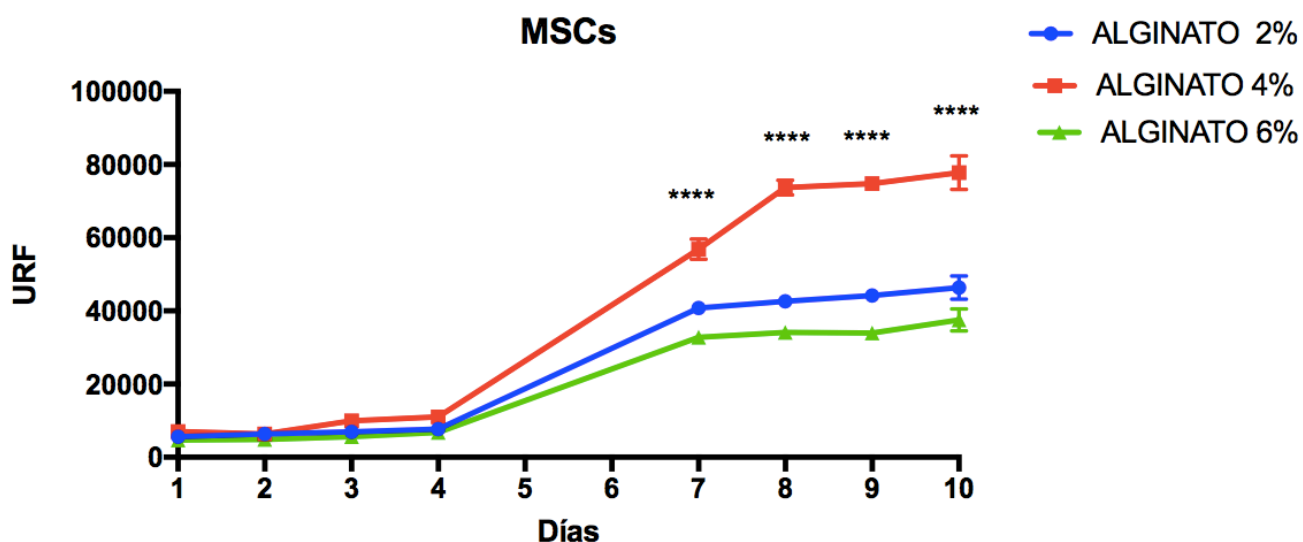
8.2.2 Efecto de la concentración de alginato en el sistema de andamiaje sobre el mantenimiento de la proliferación celular.

La evaluación cuantitativa de la proliferación celular se realizó mediante el ensayo Alamar-Blue® durante 10 días, en dos tipos celulares para evaluar la versatilidad del sistema de hidrogel: MSCs de humano y fibroblastos de la línea 3T3.

Resalta un aumento de la proliferación celular durante el periodo de cultivo tal y como se muestra en la figura 12. Este hecho confirma, a nivel celular, la excelente biocompatibilidad *in vitro* del sistema de andamiaje. Con respecto a la actividad metabólica de las MSCs cultivadas sobre los 3 diferentes andamios (2, 4 y 6%), se observa para todos ellos un incremento hasta el día 8 para luego entrar en una meseta al día 10. Entre las 3 concentraciones, los andamios al 4% sostuvieron la proliferación de manera más eficiente en comparación con la de 2 y 6%, evidenciando una diferencia estadísticamente significativa (fig. 9a). Así mismo, se obtuvieron resultados similares en la curva de proliferación de los fibroblastos de la línea 3T3 (fig.9b), observándose una tasa de proliferación positiva y un incremento que llega a su punto máximo al día 7 y a partir de ahí se mantiene estacionario. De forma similar, los andamios al 4% sostuvieron la proliferación de las células 3T3 de manera más eficiente que los de 2 y 6%.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la actividad metabólica entre los dos tipos celulares. Estos datos, demostraron el carácter biocompatible y su idoneidad cuando la concentración de alginato es fijada al 4%.

a)



b)

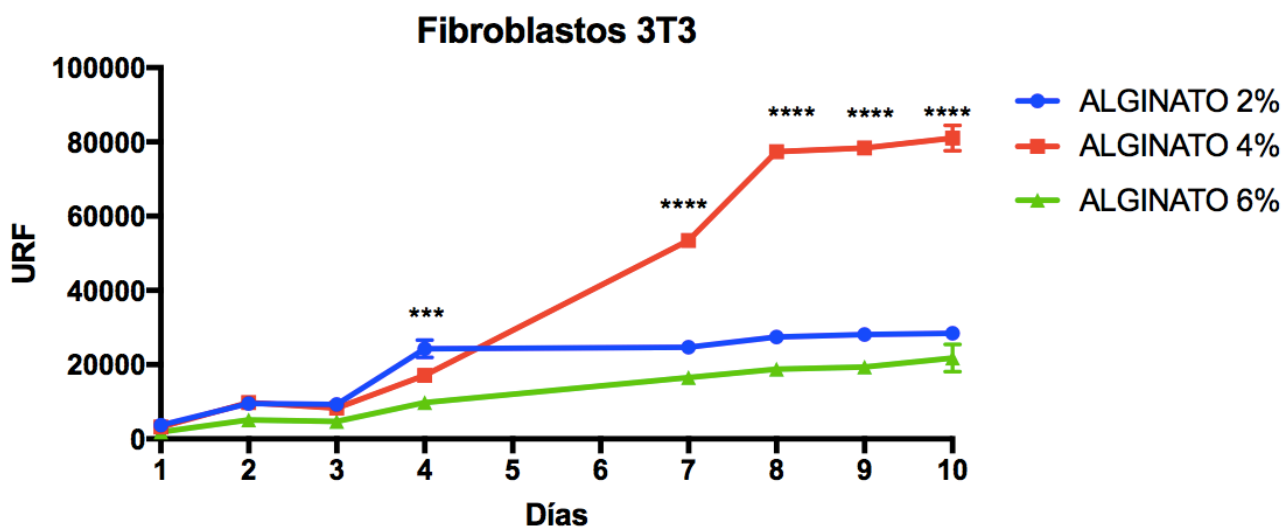


Figura 9. Ensayo de proliferación por el método de Azul Alamar de la línea celular de MSCs y fibroblastos 3T3 embebidas en los implantes 3D de alginato a diferentes concentraciones. a) Curva de proliferación de las MSCs de origen porcino. b) Curva de proliferación de los fibroblastos de la línea celular 3T3.

Las barras representan la media \pm SD $n=3$. *** $p=0.0006$ **** $p<0.0001$

8.2.3 Análisis de la ultraestructura por microscopía electrónica de barrido (SEM).

Con el fin de poder correlacionar los datos obtenidos en el ensayo de proliferación de los dos tipos celulares, las MSCs y los fibroblastos de la línea 3T3 con las características ultraestructurales del biomaterial, se procedió a preparar los implantes sin celularizar y celularizados para microscopía electrónica de barrido tal como se ilustra en la parte de la metodología referente a este ensayo.

Las propiedades ultramicroscópicas del implante pudieron ser apreciadas mediante su escaneo. Primeramente se analizaron los implantes sin celularizar para observar el entramado de la red que presenta este biomaterial, en el caso de los implantes de alginato a la concentración de 2% (fig.10a y 10b) se puede observar en las micrografías tomadas a 1500x y 3000x el entramado de la red de alginatopresentando tamaños de poro pequeños y homogéneos que van desde 0.7 μ hasta los 2.1 μ .

En cuanto al implante de alginato a la concentración de 4% (fig. 11a y 11b) podemos observar diferencias importantes en la ultraestructura de la superficie del biomaterial debido a la presencia de microporos y macroporos, donde el rango del tamaño de poro fue desde los 2.4 μ hasta los 17 μ .

Con respecto al implante de alginato a la concentración de 6% se pudo observar una ultraestructura de la superficie casi plana, con poros muy pequeños que van desde los 0.4 μ hasta los 1.6 μ , tal como se muestra en la micrografía (fig.12a y 12b).

a)

b)

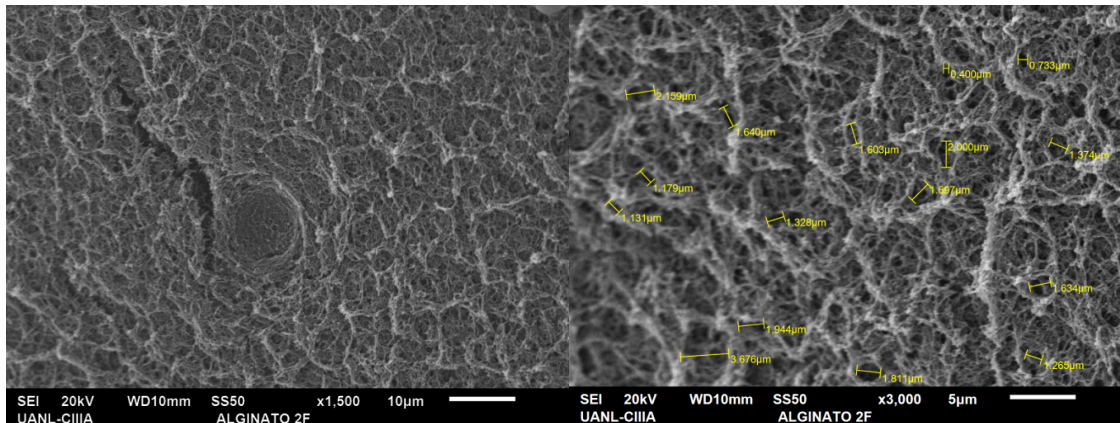


Figura 10. Ultramicroestructura del implante de alginato a la concentración de 2% por microscopía electrónica de barrido. a) Micrografía a 1,500x que muestra el entramado de la red del biomaterial. b) Micrografía a 3,000x para la determinación del tamaño de poro a esta concentración.

a)

b)

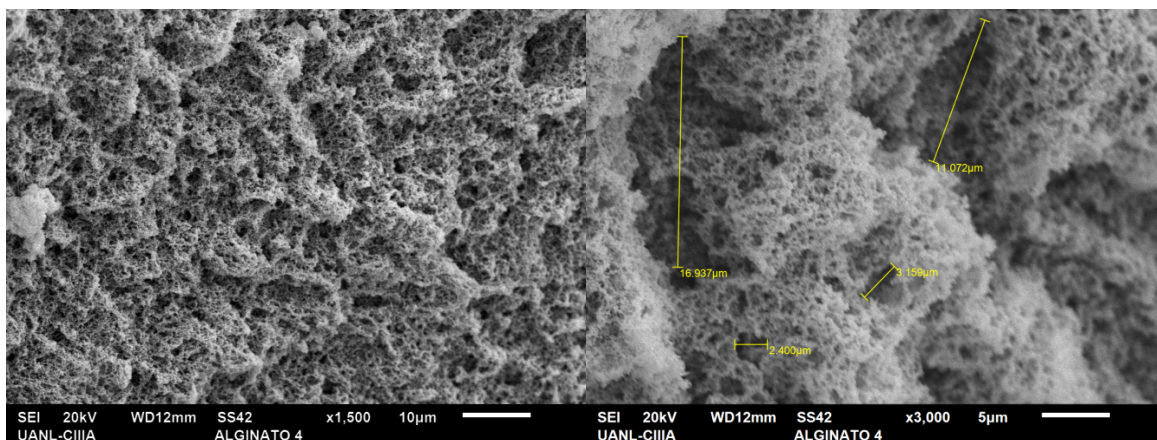


Figura 11. Ultramicroestructura del implante de alginato a la concentración de 4% por microscopía electrónica de barrido. a) Micrografía a 1,500x que muestra la textura y entramado de la red del biomaterial. b) Micrografía a 3,000x para la determinación del rango de tamaño de poro a esta concentración donde podemos apreciar la presencia macro poros y microporos.

a)

b)

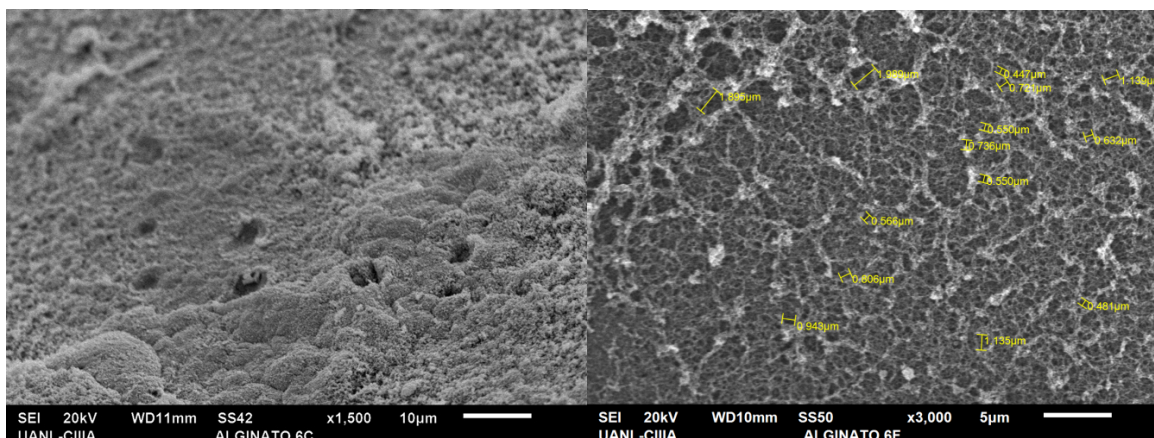
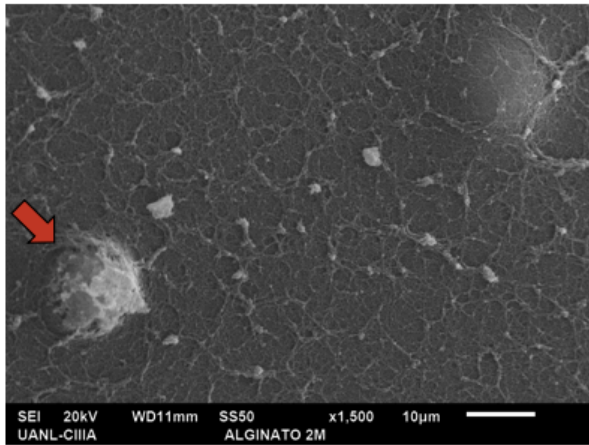


Figura 12. Ultramicroestructura del implante de alginato a la concentración de 6% por microscopía electrónica de barrido. a) Micrografía a 1,500x que muestra la textura y entramado de la red del biomaterial. b) Micrografía a 3,000x para la determinación del rango de tamaño de poro a esta concentración donde podemos apreciar la presencia macroporos y microporos.

Después del análisis de la ultraestructura de la superficie del implante a cada concentración y con el fin de analizar cómo interaccionan las células con el biomaterial, se procedió a evaluar 2 tipos celulares, las MSCs y los fibroblastos de la línea 3T3.

Con respecto al implante de alginato al 2% celularizado con MSCs de origen porcino, en las micrografías (fig. 13) podemos observar a las células embebidas en la red de alginato. En contraste, el implante del alginato a la concentración del 4% (fig.14a), muestra claramente la secreción de matriz extracelular secretada por el componente celular (fig.14b) y en un escaneo panorámico la manera cómo las células se encuentran embebidas en la red del biomaterial. En la figura 15a se muestra la ultramicroestructura del implante a la concentración de 6% y se observa cómo las células interaccionan con mucha menor afinidad hacia el biomaterial y en concordancia la secreción de matriz extracelular se aprecia escasa y compacta (fig. 15b).

a)



b)

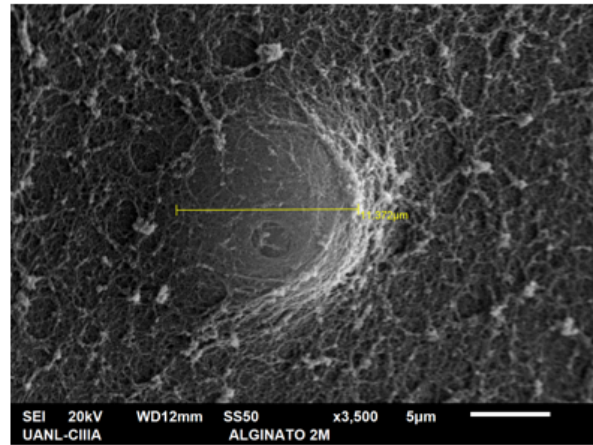
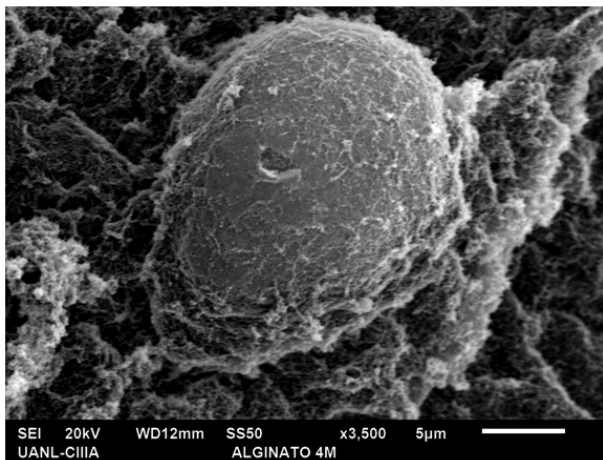


Figura 13. Ultramicroestructura del implante de alginato al 2% celularizado con MSCs de origen porcino. a) Micrografía a 1,500x donde la flecha indica una de las células embebida en la red del biomaterial. b) Micrografía a 3,500x donde puede apreciar el tamaño de la célula de aproximadamente 11µ con la barra de medición.

a)



b)

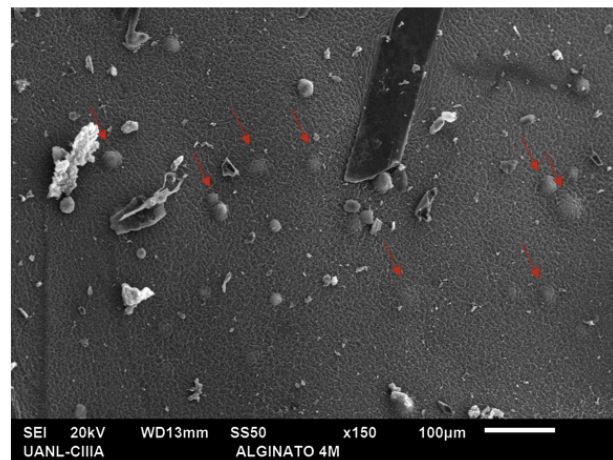
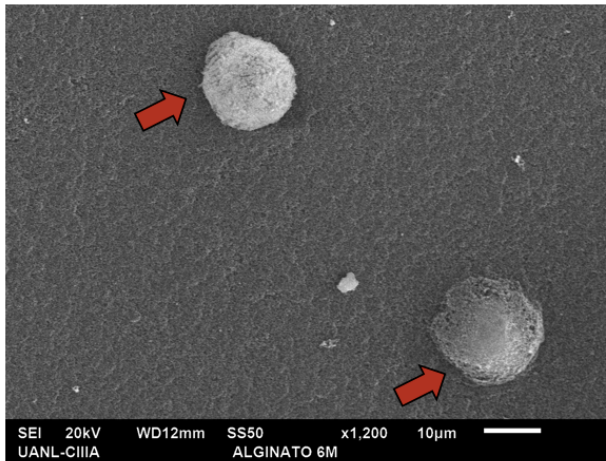


Figura 14. Micrografía del implante de alginato al 4% celularizado con MSCs de origen porcino. a) Micrografía a 3,500x donde se observa una célula y cómo la secreción de matriz rodea a ésta. b) Micrografía a 150x donde se aprecia de manera panorámica la superficie del implante. Las flechas indican las células embebidas en la red del biomaterial.

a)



b)

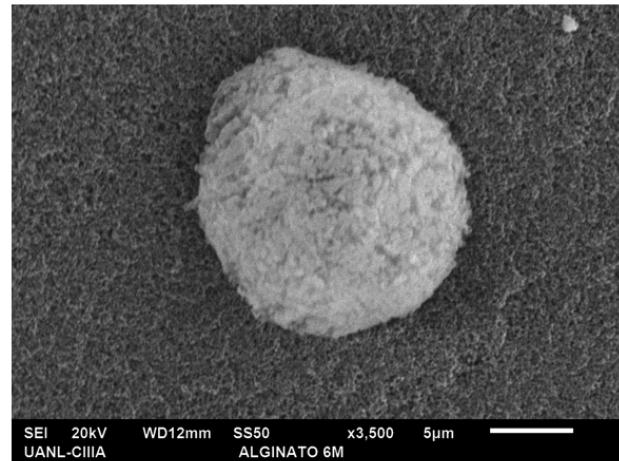
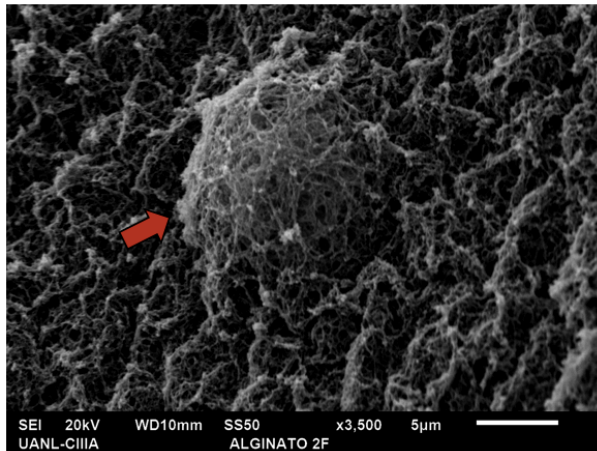


Figura 15. Micrografía del implante de alginato al 6% celularizado con MSCs de origen porcino. a) Micrografía a 1,200x donde las flechas indican las células casi en la superficie del implante. b) Micrografía a 3,500x donde se aprecia una célula y cómo la secreción de matriz la rodea y ésta interacciona en menor grado con la red del biomaterial.

Respecto a los fibroblastos de la línea celular 3T3, en las micrografías del implante correspondiente a la concentración de alginato al 2% (fig16a), se puede observar la textura y el entramado de la red del alginato y el patrón de adherencia que presenta este tipo celular (fig.16b) donde a un aumento de 1,500x podemos observar como el sitio de interacción entre la célula y el biomaterial está rodeado por matriz extracelular secretada por la célula. En el caso del alginato a la concentración de 4% celularizado con este mismo tipo celular, se aprecia de manera panorámica la ultraestructura de la superficie del implante y cómo las células se encuentran embebidas dentro de la red del biomaterial (fig. 17a) así como la secreción de matriz extracelular, lo que indica que la célula se encuentra favorecida por el microambiente (fig. 17b). Finalmente, en el caso del implante de alginato a la concentración del 6% (fig. 19a), se aprecia una superficie claramente plana carente de poros que permitan el anclaje de las células (fig. 19b).

a)



b)

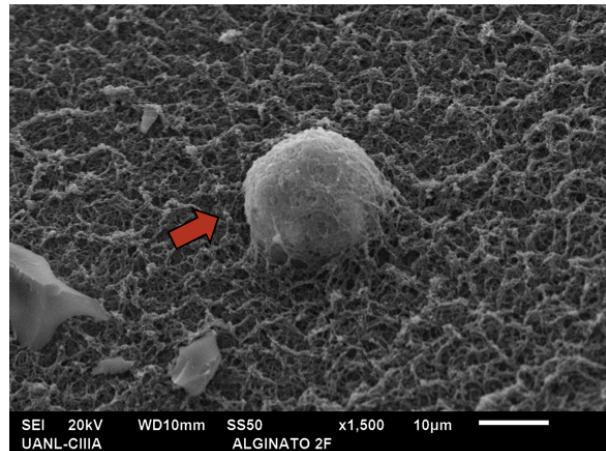
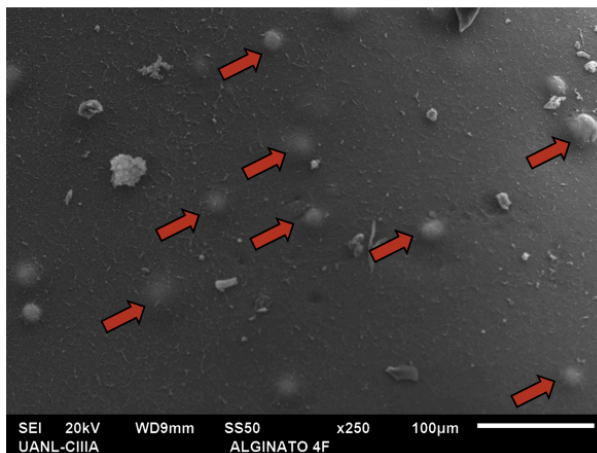


Figura 16. Micrografía del implante de alginato al 2% celularizado con fibroblastos de la línea 3T3. a) Micrografía a 3,500x donde se aprecia la textura de la red del biomaterial. b) Micrografía a 1,500x donde se aprecia el patrón de adherencia de una célula y la secreción de matriz. Las flechas indican la célula.

a)



b)

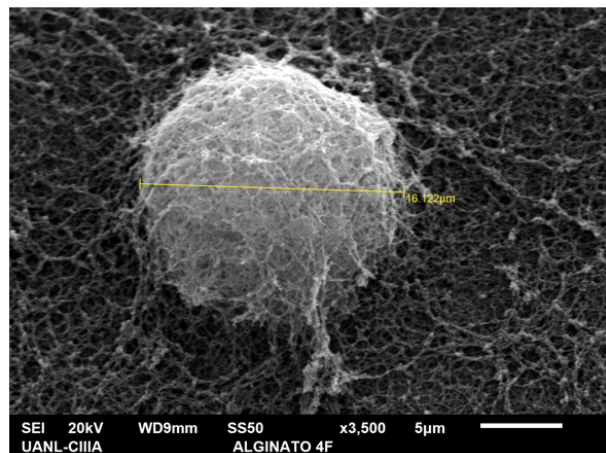


Figura 17. Micrografía del implante de alginato al 4% celularizado con fibroblastos de la línea 3T3. a) Micrografía a 250x donde se aprecia de manera panorámica la superficie del implante, las flechas indican los fibroblastos embebidos en la red del biomaterial. b) Micrografía a 3,500x donde se aprecia el tamaño de la célula de aproximadamente 16μ, su patrón de adherencia y la secreción de matriz.

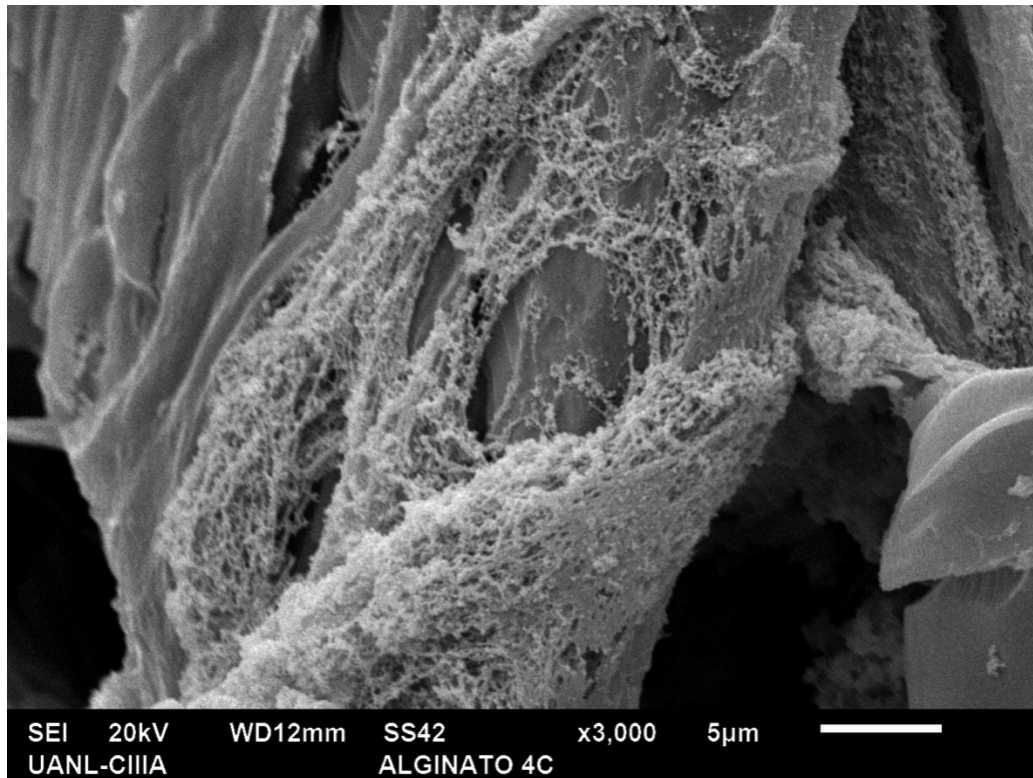
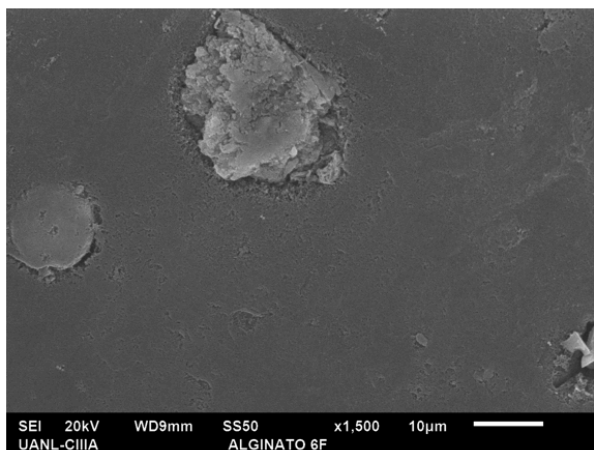


Figura 18. Micrografía a 3,000x del implante de alginato al 4% celularizado con fibroblastos de la línea 3T3 donde observamos la interacción entre la matriz secretada por la célula y el biomaterial.

a)



b)

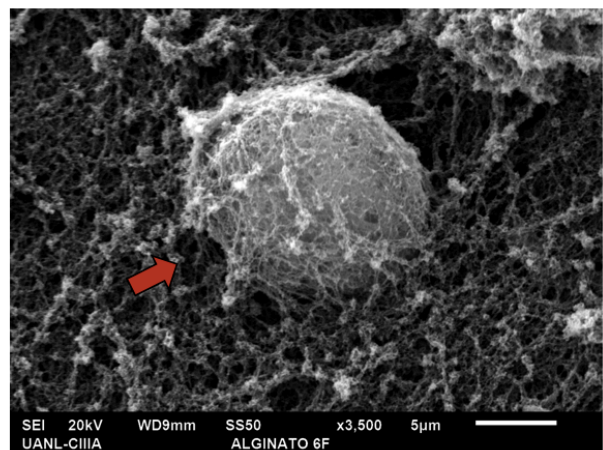


Figura 19. Micrografía del implante de alginato al 6% celularizado con fibroblastos de la línea 3T3. a) Micrografía a 1,500x donde se aprecia de manera panorámica la superficie del implante. b) Micrografía a 3,500x donde se aprecia una célula marcada por la flecha roja y cómo ésta se ancla a la red del biomaterial.

8.3 1. Inmovilización del factor VEGF en el andamio de alginato y evaluación de la concentración que sostenga la proliferación de las células presentes en la SVF humana

Ya que con los resultados del ensayo de proliferación celular mostrados anteriormente se logró determinar que la concentración de alginato al 4% fue la que sostuvo con mayor eficiencia la proliferación celular, se tomó esta concentración como la idónea para trabajar en el siguiente ensayo correspondiente a la de biofuncionalización del hidrogel de alginato con el VEGF.

Para esto se llevó a cabo la reacción EDC/NHS explicada anteriormente en la sección de Materiales y Métodos, para lograr la conjugación del biomaterial con el VEGF, que consistió en la adición de los reactivos EDC y NHS al alginato para producir una unión covalente por un enlace amida entre los grupos carboxilo del biomaterial y los grupos amino del VEGF.

Esta conjugación se confirmó mediante espectroscopia infrarroja utilizando un Espectrofotómetro de Infrarrojo por Transformada de Fourier (FT-IR) (Thermo Scientific Modelo Nicolet iS10) con una fuente MIR y con el módulo SmartOrbit ATR/Avatar. Y con el software OMNIC 8.2 (Thermo Scientific). Con espectros obtenidos en la región del infrarrojo entre 4000 cm^{-1} y 400 cm^{-1} y siguiendo la siguiente nomenclatura para cada muestra:

Muestra 1: Alginato 0 ng

Muestra 2: Alginato 50 ng

Muestra 3: Alginato 100 ng

Se obtuvieron los espectros de Infrarrojo (fig. 20) en los que se puede identificar que las muestras presentan dos bandas de absorción características en torno a 1620 cm^{-1} y 1420 cm^{-1} , correspondientes a la vibración de estiramiento asimétrica y simétrica de los grupos $-\text{COO}$, respectivamente. Cabe resaltar, que en los espectros de las muestras 1 y 2, se aprecia la banda a 2935 cm^{-1} y es debida a la vibración de $-\text{CH}$ al igual que la banda en 1420 cm^{-1} , esta última se puede superponer con las bandas de vibración $-\text{COO}$, la cual desaparece en la muestra 3 correspondiente al implante funcionalizado con la mayor concentración de VEGF. La banda del estiramiento de C-O-C se produce alrededor de 1050 cm^{-1} y una banda de absorción grande a 3273 cm^{-1} , debido a la vibración de estiramiento del grupo $-\text{OH}$.

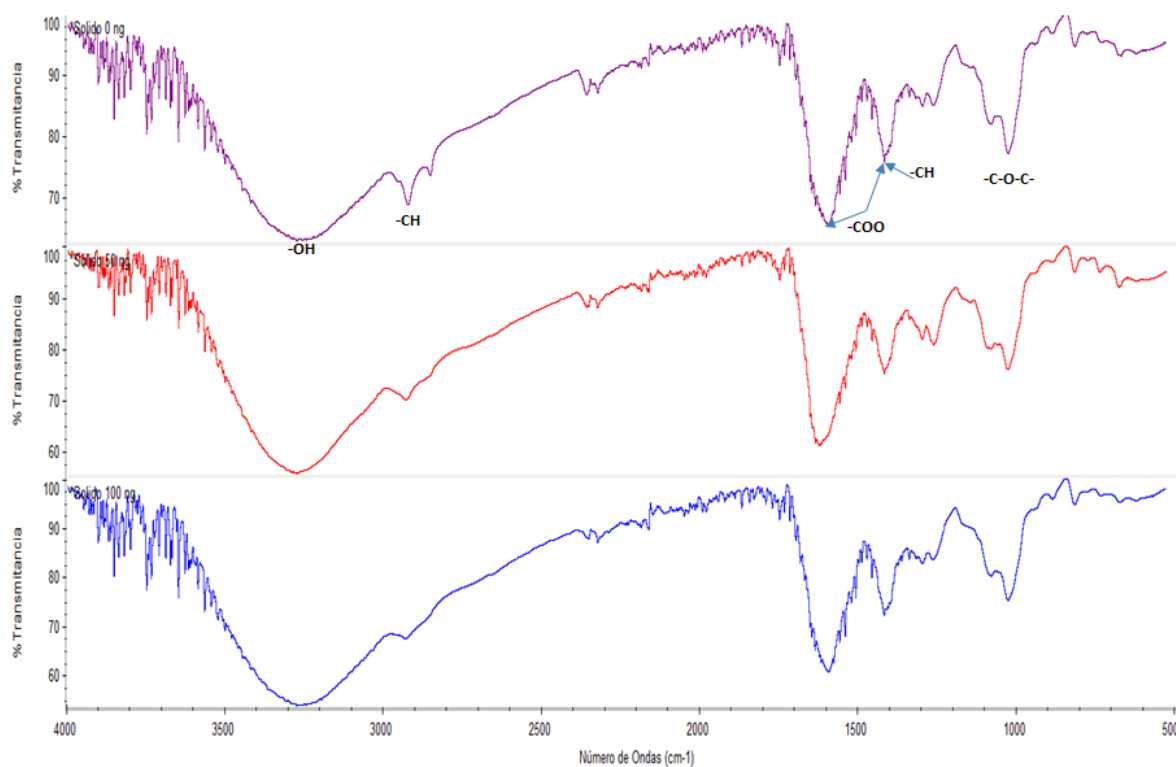


Figura 20. Espectro de Infrarrojo de las muestras 1 (morado), 2 (rojo) y 3 (azul).

Una vez confirmada la inmovilización del VEGF, se procedió a evaluar la proliferación celular por el método de Azul Alamar (fig. 21). Para esto, se llevaron a cabo las lecturas fluorométricas de los implantes de alginato celularizados con 5×10^5 células de la SVF y funcionalizados con el VEGF a las concentraciones de 50 ng, 100 ng y un control sin VEGF y se graficaron con ayuda del software *prism 7*. Se puede observar que la presencia del factor VEGF en una concentración de 100 ng, ejerce un efecto positivo sobre el soporte de la proliferación de las células adheridas sobre el andamio de alginato al 4% y que este efecto es incluso al día 7 estadísticamente significativo cuando se compara contra el control sin VEGF.

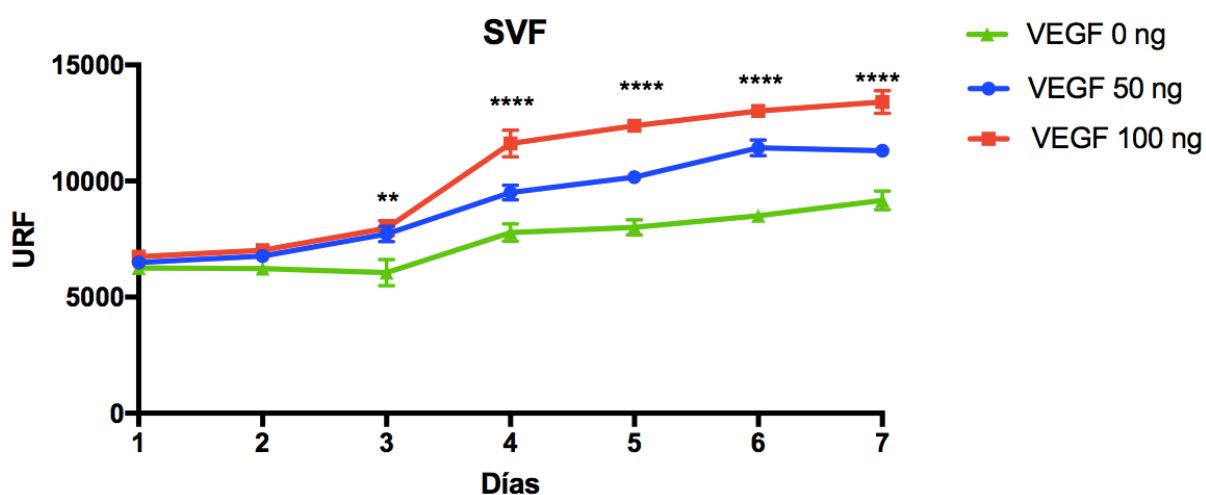


Figura 21. Ensayo de proliferación celular por triplicado de los implantes de alginato biofuncionalizados con VEGF. Las barras representan la media \pm SD $n=3$.

** $p=0.0016$ **** $p<0.0001$

CAPÍTULO IX

DISCUSIÓN

9.1 Aislamiento y caracterización de las células madre de la SVF y evaluación de su troncalidad y potencial multilinaje.

Para el diseño de un implante que cumpliera con los criterios para su potencial aplicación en la clínica, se pensó en un tipo celular que no tuviera la necesidad de pasar por cultivo celular para su expansión, como alternativa para su uso en el tratamiento de afecciones isquémicas. Este es el caso de la SVF autóloga de tejido adiposo, ya que las células derivadas del tejido adiposo, sin cultivo ni expansión previa, obtenidas a través de intervenciones mínimamente invasivas, permiten la implementación de la terapia autóloga de tipo "*point of care*" (terapias de implementación en el punto de atención) que se realizan del comienzo al fin en una única intervención quirúrgica, evitando la necesidad de implementación de una fase de cultivo celular que implica tiempo, instalaciones y personal especializados además de considerables recursos.

De igual forma, con el fin de no sólo analizar la SVF de origen humano, sino también la de un modelo animal para futuros ensayos *in vivo*, se seleccionó un modelo porcino al cual se le practicó una lipectomía para la obtención de la SVF de origen animal.

Jaewoo Pak y cols. [44] implementaron el protocolo clínico de obtención de la SVF autóloga para su potencial uso en diversas afecciones como lo son las afecciones óseas. En base a su técnica pudimos obtener esta fracción del tejido adiposo para la celularización del biomaterial utilizado.

La SVF, también conocida como fracción mononuclear del tejido adiposo, fue descrita en sus inicios como una fuente activa mitóticamente de precursores adiposos como las MSCs [45]. Estas células son semejantes a los fibroblastos

morfológicamente (fig. 5) y en el ensayo de evaluación de su potencial multilíneaje (fig. 6 y 7), se demostró su capacidad para diferenciarse *in vitro* a preadipocitos, condrocitos y osteocitos dando como positivo para las tinciones de Rojo Oleoso, Azul Alcian y Rojo de Alizarina. Donde encontramos las estructuras características de estos linajes tanto en la SVF de origen porcino como en las células de origen humano, estos fueron gotas de aceite dentro del citoplasma de las células evidenciadas con la tinción de Rojo Oleoso, la presencia de proteoglicanos teñidos de color azul con el colorante Azul Alcian y depósitos de calcio característicos del linaje osteogénico [46,47].

Las MSCs no solo tienen la capacidad de diferenciarse a diferentes líneas celulares de origen mesodérmico: adiposas, cartilaginosas y óseas [48] sino que también pueden diferenciarse a células de origen endodérmico y ectodérmico [49, 50].

9.2. Desarrollo del implante

Para lograr la eficiente retención de las células, el andamiaje utilizado en este trabajo fue el alginato en hidrogel, que es un biopolímero utilizado en una gran variedad de aplicaciones biomédicas gracias a sus propiedades de biocompatibilidad y nula toxicidad [51,52], facilitó el moldeamiento del implante generado (fig. 8a y 8b) así como la retención celular (fig. 8c).

Ya que este implante está dirigido hacia el favorecimiento de la regeneración de tejidos propensos a daño como la piel, las dimensiones de tamaño del implante generado fueron seleccionadas en base a la anatomía de la piel humana, cuyas medidas oscilan dependiendo la zona del cuerpo que son: para la epidermis que tiene un espesor de 0.5-1.5 mm, para la dermis que posee un espesor de 2-3mm y la hipodermis que cuenta con un espesor 0.5-1mm (fig.1) aproximándose a los 5mm, el espesor de los implantes generados en este trabajo para el soporte celular.

9.2.1 Ensayo de proliferación celular

Con respecto la viabilidad y proliferación celular en el biomaterial a las concentraciones de 2, 4 y 6% y trabajando con dos tipos celulares: MSCs de origen porcino y fibroblastos 3T3, la concentración de 4% (fig. 9a y 9b) fue la que mostró la tasa de proliferación positiva más alta en ambos tipos celulares evaluados por el método fluorométrico de Azul Alamar, ya que se ha demostrado que el alginato gracias a su capacidad de presentar tamaños de poro variables dependiendo de la concentración a la que se maneje (5-200 nm) de acuerdo a lo descrito por *Wang y cols* [53], constituye un microambiente propicio para la división celular, la interacción, y el intercambio y difusión de nutrientes.

En ambos tipos celulares se presentó una curva de crecimiento celular muy similar, alcanzado su punto máximo a los siete días y a partir del octavo día se mantuvo estacionaria, lo que nos indica que el número de días en que se evaluó la proliferación son suficientes para la duración del ensayo.

Con esto demostramos que los modelos de cultivo en 3D pueden proporcionar un microambiente celular que imita estrechamente las características biológicas observadas en los tejidos nativos, incluidas las complejas interacciones célula-matriz.

9.2.2 Análisis de la ultramicroestructura de los implantes mediante SEM

Diversos grupos de investigación, como el de *Liu Q y cols* [46] se han centrado en proponer al alginato como un potente factor angiogénico y acelerador de la cicatrización. El uso del alginato en hidrogel sirvió como base primordial que nos permitió la fácil generación del implante con la eficiente retención de las células.

Una gran variedad de estudios previos han garantizado la habilidad del alginato como soporte 3D para el diseño de implantes utilizados en regeneración de tejidos [54]. Y analizando los datos de proliferación celular obtenidos en este trabajo se

buscó correlacionar estos resultados con las características estructurales del implante, donde la microscopía electrónica de barrido nos brindó un panorama para esta comprensión.

Ya que la concentración de 4% de alginato nos proporcionó un tamaño de poro entre el rango de 2.4 a 17 μ que favoreció la proliferación de los tipos celulares estudiados; en un estudio similar de *Mcmillan y cols.* [55], se observa que las películas de caprolactona con poros de entre 3-20 μ mostraron los niveles más altos de adhesión y supervivencia celular, en fibroblastos, queratinocitos y MSCs ya que este tamaño de poro permite la comunicación célula-célula, junto con la difusión de nutrientes solubles y factores del medio de cultivo por lo que esta característica se considera importante en el desarrollo de implantes para su uso en el tratamiento de afecciones isquémicas como las heridas en piel humana.

Con el análisis ultramicroscópico (fig. 10, 11 y 12), se pudo observar como el hidrogel de alginato presentaba su forma de red característica conocida como “cartón de huevo” [55]. Y como en la concentración de 4%, la proliferación celular se vió favorecida gracias a la presencia de macro poros y micro poros. Estos datos nos sugieren que las células se distribuyeron de manera homogénea dentro de los implantes y quedaron embebidas gracias a la naturaleza del biomaterial.

En cuanto al análisis para comprender la interacción del biomaterial con las células, empleando los tipos celulares de MSCs de origen porcino (fig. 13, 14 y 15) y los fibroblastos de la línea 3T3 (fig.16, 17 y 19) pudimos observar que ambos tipos celulares embebidos en el biomaterial se comportaron de manera similar. Donde el efecto del microambiente y la naturaleza del biomaterial propiciaron que la morfología celular se mantuviera esférica, observándose cómo las células interactúan con la red de alginato e impulsan la secreción de matriz extracelular, lo que indica que la célula se vea favorecida por el entorno.

Siguiendo el escaneo en la muestra correspondiente al implante a la concentración de 4% de alginato, se logró observar la interacción de la matriz extracelular con el

biomaterial (fig.18), lo que nos habla de la funcionalidad de las células activas que al estar embebidas se diseminan y migran a través del entramado de la red de alginato por lo tanto, este sistema de andamiaje resulta adecuado para favorecer el crecimiento y viabilidad celular.

9.3 Definición de la concentración de VEGF que en combinación con el alginato permita una eficiente proliferación de las células de la SVF.

Con el fin de verificar la eficacia de la conjugación del alginato con las moléculas de VEGF, se llevó a cabo la reacción EDC/NHS explicada con anterioridad, las muestras de alginato con 50 ng y 100 ng se liofilizaron para su análisis por espectroscopia infrarroja así como una muestra de alginato sin la presencia del factor.

En el espectro de absorción pudimos detectar que las tres muestras presentan similitud entre ellas y que todas corresponden al patrón de bandas característico del alginato. Fue posible detectar diferencias en algunas bandas que corresponden a las vibraciones del enlace -CH de la muestra de alginato 0ng con respecto a las muestras de alginato que presentan concentraciones de VEGF de 50 y 100 ng (fig.20). Debido a la sensibilidad de la técnica no se logra establecer categóricamente si se trata de un enlace amida, ya que las concentraciones del VEGF utilizadas oscilan en el rango nanométrico y no es posible emplear concentraciones mayores del factor VEGF ya que como se establece en un estudio reportado por *Yin y cols 2016*, la utilización de concentraciones de VEGF superiores a 100 ng imposibilita el proceso de gelificación necesario para el proceso de reticulación del alginato y genera un drástico decremento en la proliferación de las células, por lo que concentraciones mayores resultan incompatibles con el diseño del implante.

Aún así se puede inferir que estas diferencias con respecto al control en el gráfico de absorbancia rondando la posición 3000 cm^{-1} debido a la vibración de estiramiento del -OH presente en el grupo carboxilo, indican que este grupo está interactuando con otra molécula presente la cual no es identificada por esta técnica. Por lo que sería conveniente utilizar un método más sensible que detecte concentraciones a nivel de nanogramos.

Con respecto al ensayo de proliferación, se obtuvo una curva de crecimiento con una tasa de proliferación positiva (fig. 21) en donde pudimos detectar que la muestra correspondiente al implante biofuncionalizado con 100ng mostró una mayor tasa proliferación comparada contra los implantes control sin la presencia del VEGF y con 50 ng del factor.

Estos datos se familiarizan con la literatura según *Shusheng Wang y Cols. 2008* ya que está reportado que el VEGF es un potente factor que favorece la migración y proliferación de diversos tipos celulares, como lo son las células epiteliales y las MSCs presentes en la SVF que es la fuente celular del implante generado en este trabajo.

CAPÍTULO X CONCLUSIONES

Se logró definir que un implante basado en alginato al 4% y biofuncionalizado con VEGF en una concentración de 100 ng (concentración final) provee de un entorno topográfico y biológico favorable para la proliferación, adhesión y distribución de las células presentes en la SVF, así como para la secreción de matriz extracelular; lo que lo hace potencialmente atractivo para su posible aplicación en la reparación de tejidos dañados que requieran de una rápida restauración, como las afecciones isquémicas y las heridas de espesor completo de la piel.

CAPÍTULO XI PERSPECTIVAS

Queda como perspectiva de este trabajo, la evaluación *in vivo* del potencial regenerativo de este implante aplicado sobre heridas en un modelo animal; tomando como parámetros de éxito la presencia de marcadores angiogénicos y de reepitelización, así como la calidad de la regeneración mediante histología.

ANEXO I PREMIOS Y CONGRESOS


1° Primer lugar en la categoría de Innovación terapéutica del Congreso Internacional de Dermatología 2019.

“Diseño y evaluación de un sustituto dérmico basado en alginato celularizado con fibroblastos 3T3 para su potencial aplicación en la regeneración de la piel”.
Monterrey, NL. 14 - 17 de marzo 2019.



XXXII Congreso Nacional de Bioquímica 2018.

"Evaluation of the fibroin and the alginate as biomaterials of scaffolding for the growth of cells from the vascular stromal fraction". Ixtapa, Zihuatanejo. 4-9 de noviembre 2018.



Sociedad Mexicana de Bioquímica, A.C.
FUNDADA EN 1957

AV. CIPRESES SIN COL. SAN ANDRÉS TOTOLTEPEC
C.P. 34400 MÉRIDO, Q.F.
APARTADO POSTAL 70-406. CIUDAD UNIVERSITARIA
TEL. Y FAX. (55) 6620-5742
http://www.smbq.org.mx
Correo Electrónico: smbq@ic.unam.mx

MESA DIRECTIVA 2017 - 2018

PRESIDENTE
DRA. IRENE BEATRIZ CASTAÑO NAVARRO

VICEPRESIDENTE
DR. DAVID RENÉ ROMERO CANARENA

SECRETARIO TESORERO
DR. JORGE LUIS FOLCH MALLOL

SUBSECRETARIA TESORERA
DRA. MARIA SOLEDAD FUNES ARGÜELLO

SOCIOS FUNDADORES

- Dr. Barbarin Arreguin Lozano
- Dr. Edmundo Calva Cuadrilla
- Dr. Guillermo Carvajal Sandoval (†)
- Dr. Joaquín Cravioto (†)
- Dr. Carlos del Río Estrada (†)
- Dr. Silvestre Frenk Freund
- Dr. Mario García Hernández (†)
- Dr. Jesús Guzmán García (†)
- Dr. Jesús Irujo Rodríguez
- Dr. José Laguna García (†)
- Dr. Guillermo Massieu Helguera (†)
- Dr. Raúl Ondarza Vidaumeta
- Dr. Efraín S. Pardo Codina
- Dr. Guillermo Soberón Acevedo

Otorga la presente

CONSTANCIA a:

Susana Gabriela Cárdenas Ramos

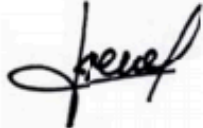
Quien asistió y presentó el trabajo:

**EVALUATION OF THE FIBROINE AND THE ALGINATE AS A BIOMATERIAL
OF SCAFFOLDING FOR THE GROWTH OF CELLS FROM THE VASCULAR
ESTROMAL FRACTION**

Por: Susana G. Cárdenas-Ramos, Nidia K. Moncada-Saucedo,
Alejandro García-Ruiz, Vanessa Pérez-Silos, Mayra Bazán-Álvarez,
Alberto Camacho, Viktor Romero-Díaz, Iván Marino-Martínez,
Gabriel Mecott-Rivera, Lizeth Alicia Fuentes-Mera

En la modalidad de cartel durante el
XXXII Congreso Nacional de Bioquímica
4 - 9 de noviembre de 2018 en Ixtapa, Zihuatanejo, Gro.

Atentamente
Por el Comité Organizador



Dra. Irene B. Castaño Navarro
Presidente

CAPÍTULO XII

BIBLIOGRAFÍA

1. Bora P, Majumdar AS. Adipose tissue-derived stromal vascular fraction in regenerative medicine: A brief review on biology and translation. *Stem Cell Res Ther.* 2017 Jun 15;8(1):145. doi: 10.1186/s13287-017-0598.
2. Han S, Sun HM, Hwang KC, Kim SW. 2015. Adipose-Derived Stromal Vascular Fraction Cells: Update on Clinical Utility and Efficacy. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 2015;25(2):145-52.
3. Reza Tabatabaei Qomi and Mohsen Sheykhasan. 2017. Adipose-derived stromal cell in regenerative medicine: A review. *World J Stem Cells.* 2017 Aug 26; 9(8): 107–117.
4. Lim MH, Ong WK, Sugii S. 2014. The current landscape of adipose-derived stem cells in clinical applications. *Expert Rev Mol Med.* 2014 May 7;16:e8. doi: 10.1017/erm.2014.8.
5. Angelo S. M and David J. Mooney. 2015. Regenerative medicine: Current therapies and future directions. *Applied Biological Sciences, Engineering.*
6. Álvarez-lozano, E., Lara-arias, J., Mendoza-lemus, Ó. & Martínez-rodríguez, H. Ingeniería tisular en la reparación de las lesiones articulares. *Ortho-tips* 5, 308–314 (2009).
7. German, D., Falke, F. & Atala, A. Reconstrucción de tejidos y órganos utilizando ingeniería tisular. *Arch.argent.pediatr* 98, 103–115 (2000).
8. Longo, U. G. et al. 2012. Stem cells and gene therapy for cartilage repair. *Stem Cells Int.* 2012, 1–9.
9. Raposio E, Bertozzi N. 2017. How to isolate a ready-to-use adipose-derived stem cells pellet for clinical application. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2017 Sep;21(18):4252-4260.
10. German, D., Falke, F. & Atala, A. 2000. Reconstrucción de tejidos y órganos utilizando ingeniería tisular. *Arch.argent.pediatr* 98, 103–115.
11. Fergal J. O'Brien. 2011. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Materials Today.* Volume 14, Issue 3, March 2011, Pages 88-95.
12. Cristina Castells-Sala, Mireia Alemany-Ribes, Teresa Fernández-Muiños, Lourdes Recha-Sancho, Patricia López-Chicón, Caterina Aloy- Reverté, Javier Caballero-Camino, Alejandro Márquez-Gil. 2013. Current Applications of Tissue

Engineering in Biomedicine. Journal of Bioengineering and Bioelectronics. Doi:10.4172/2153-0777.S2-004.

13. Christian Mandrycky, Kiet Phong, and Ying Zheng. Tissue engineering toward organ-specific regeneration and disease modeling. MRS Communication. 2017 Sep; 7(3): 332–347.

14. Rodolfo Jesús González Paz, José Roberto Vega Baudrit y Kiara Riccardi Hernández. 2014. Ingeniería de tejidos y biocompatibilidad: nanomateriales biomiméticos, agua, mineralización y respuesta celular. Revista Digital Universitaria UNAM. ISSN: 1607 – 6079.

15. Sumrita Bhat and Ashok Kumar. 2013. Biomaterials and bioengineering tomorrow's healthcare. Bhat S, Kumar A. Biomaterials and bioengineering tomorrow's healthcare. Biomatter.3(3):e24717. doi:10.4161/biom.24717.

16. Walter JG, Urmann K, Modrejewski J, Scheper T. Aptamer-modified nanomaterials: principles and applications. BioNanoMat 2017.

17. Hench LL, Thompson I. Twenty-first century challenges for biomaterials. J R Soc Interface 2010;7(Suppl 4):S379-91; PMID:20484227.

18. Hench LL, Polak JM. Third-generation biomedical materials. Science 2002; 295:1014-7; PMID:11834817 agents. J. Biotechnol. 2006, 122, 372–381.

19. Hill, D.S.; Robinson, N.D.; Caley, M.P.; Chen, M.; O'Toole, E.A.; Armstrong, J.L.; Przyborski, S.; Lovat, P.E. A novel fully humanized 3D skin equivalent to model early melanoma invasion. Mol. Cancer Ther. 2015, 14, 2665–2673.

20. Peter X Ma, PhD. Biomimetic Materials for Tissue Engineering. Adv Drug Deliv Rev. 2008 January 14; 60(2): 184–198. doi:10.1016/j.addr.2007.08.041

21. Huang L, Hu J, Lang L, Wang X, Zhang P, Jing X, Wang X, Chen X, Lelkes PI, Macdiarmid AG, Wei Y. Synthesis and characterization of electroactive and biodegradable ABA block copolymer of polylactide and aniline pentamer. Biomaterials 2007;28:1741–51.

22. Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. Science 1993;260:920–6. [PubMed: 8493529]

23. Ma PX. Scaffolds for tissue fabrication. Materials Today 2004;7:30–40.

24. Atzei A, Calcagni M, Breda B, Fasolo G, Pajardi G, Cugola L. Clinical evaluation of a hyaluronan-based gel following microsurgical reconstruction of peripheral nerves of the hand. Microsurgery 2007; 27:2-7

25. Ma, PX. Tissue Engineering. In: Kroschwitz, JI., editor. Encyclopedia of Polymer Science and Technology. Third. 12. John Wiley & Sons, Inc.; Hoboken, NJ: 2005. p. 261-291.
26. Sumrita Bhat and Ashok Kumar. Biomaterials and bioengineering tomorrow's healthcare. *Biomatter* 3:3, e24717; July/August/September 2013; © 2013 Landes Bioscience.
27. Paul C, Robert MN. Bioengineering: 25 years of progress—but still only a beginning. *Technol Soc* 2004; 26:415-31
28. Chatterjee S, Gardner TJ. Factors determining selection of valve prosthesis tissue or mechanical: current status. *Adv Cardiol* 2002; 39:189-94.
29. Ramakrishna S, Mayer J, Winter mantel E, Leong KW. Biomedical applications of polymer-composite materials: a review. *Compos Sci Technol* 2001; 61:1189-224
30. Rice JJ, Martino MM, De Laporte L, Tortelli F, BriquezPS, Hubbell JA. Engineering the regenerative microenvironment with biomaterials. *Adv Healthc Mater* 2013;2:57-71; PMID:231
31. Kirschnera CM, Ansetha KS. Hydrogels in healthcare: From static to dynamic material microenvironments. *Acta Mater* 2013
32. Leonardi M, Pitchon EM, Bertsch A, Renaud P, Mermoud A. Wireless contact lens sensor for intraocular pressure monitoring: assessment on enucleated pig eyes. *Acta Ophthalmol* 2009; 87:433-7
33. Badugu R, Lakowicz JR, Geddes CD. A glucose sensing contact lens: from bench top to patient. *Curr Opin Biotechnol* 2005; 16:100-7
34. Patterson J, Martino MM, Hubbell JA. Biomimetic materials in tissue engineering. *Mater Today* 2010; 13:14-22; [http://dx.doi.org/10.1016/S1369-7021\(10\)70013-4](http://dx.doi.org/10.1016/S1369-7021(10)70013-4).
35. Yeo A, Rai B, Sju E, Cheong JJ, Teoh SH. The degradation profile of novel, bioresorbable PCL-TCP scaffolds: An in vitro and in vivo study. *J Biomed Mater Res A* 2008; 84:208-18.
36. Urtuvia V, Maturana N, Acevedo F, Peña C, Díaz-Barrera A. Bacterial alginate production: an overview of its biosynthesis and potential industrial production. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 33 (11):198.
37. Hartmann H, Krastev R. Biofunctionalization of surfaces using polyelectrolyte multilayers. *BioNanoMat* 2017.

38. Petersen S, Harting R, Barth M, Bührke T, Pfefferle R. Functionalization of polyether therketone for application in dentistry and orthopedics. *BioNanoMat* 2017.
39. Del Angel-Mosqueda C, Gutiérrez-Puente Y, López-Lozano AP, Romero-Zavaleta RE, Mendiola-Jiménez A, Medina-De la Garza CE, Márquez-M M, De la Garza-Ramos MA (September 2015). "Epidermal growth factor enhances osteogenic differentiation of dental pulp stem cells in vitro". *Head & Face Medicine*. 11: 29.
40. Aaronson SA. "Growth factors and cancer". *Science*. 254 (5035): 1146–53.
41. Holmes K, Roberts OL, Thomas AM, Cross MJ. (Oct de 2007). Vascular endothelial growth factor receptor-2: structure, function, intracellular signaling and therapeutic inhibition. *Cell Signal*. 19 (10): 2003-2012.
42. Amo Y, Masuzawa M, Hamada Y, Katsuoka K (enero de 2004). Serum concentrations of vascular endothelial growth factor-D in angiosarcoma patients. *Br. J. Dermatol*. 150 (1): 160-1.
43. Casteilla L. Adipose-derived stromal cells: their identity and uses in clinical trials, an update. *World J Stem Cells*. 2011;3:25. doi: 10.4252/wjsc. v3.4.25.
44. Suzuki E, Fujita D, Takahashi M, et al. Adipose tissue-derived stem cells as a therapeutic tool for cardiovascular disease. *World J Cardiol*. 2015; 7:454–65. doi: 10.4330/wjc. v7. i11.707.
45. You D, Jang MJ, Kim BH, et al. Comparative study of autologous stromal vascular fraction and adipose-derived stem cells for erectile function recovery in a rat model of cavernous nerve injury. *Stem Cells Transl Med*. 2015; 4:351–8. doi: 10.5966/sctm.2014-0161.
46. Van Dijk A, Naaijken BA, Jurgens WJFM, et al. Reduction of infarct size by intravenous injection of uncultured adipose derived stromal cells in a rat model is dependent on the time point of application. *Stem Cell Res*. 2011; 7:219–29. doi: 10.1016/j.scr.2011.06.003.
47. Nguyen A, Guo J, Banyard DA, et al. Stromal vascular fraction: ¿a regenerative reality? Part 1: current concepts and review of the literature. *J Plast Reconstr Aesthetic Surg*. 2016; 69:170–9. doi: 10.1016/j.bjps.2015.10.015.
48. Guo J, Nguyen A, Banyard DA, et al. Stromal vascular fraction: ¿a regenerative reality? Part 2: mechanisms of regenerative action. *J Plast Reconstr Aesthetic Surg*. 2016; 69:180–8. doi: 10.1016/j.bjps.2015.10.014.
49. Saunders (Elsevier), ed. (2009). «Ch3-Tissue Renewal, Regeneration and Repair». *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease* (8th edition).

50. Bourin P, Bunnell BA, Casteilla L, et al. Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT) Cytotherapy.2013; 15:641–8. doi: 10.1016/j.jcyt.2013.02.006.
51. Dong, R.; Liu, X.; Liu, Y.; Deng, Z.; Nie, X.; Wang, X.; Jin, Y. Enrichment of epidermal stem cells by rapid adherence and analysis of the reciprocal interaction of epidermal stem cells with neighboring cells using an organotypic system. *Cell Biol. Int.* 2007, 31, 733–740.
52. King, A.; Balaji, S.; Keswani, S.G.; Crombleholme, T.M. The role of stem cells in wound angiogenesis. *Adv. Wound Care* 2014, 3, 614–625.
53. Dabiri, G.; Heiner, D.; Falanga, V. The emerging use of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the treatment of human chronic wounds. *Expert Opin. Emerg. Drugs* 2013, 18, 405–419.
54. Jackson, W.M.; Nesti, L.J.; Tuan, R.S. Concise review: Clinical translation of wound healing therapies based on mesenchymal stem cells. *Stem Cells Transl. Med.* 2012, 1, 44–50.
55. Nayak, S.; Dey, S.; Kundu, S.C. Skin equivalent tissue-engineered construct: Co-cultured fibroblasts/keratinocytes on 3d matrices of sericin hope cocoons. *PLoS ONE* 2013, 8, e74779.
56. Zuliani, T.; Saiagh, S.; Knol, A.C.; Esbelin, J.; Dreno, B. Fetal fibroblasts and keratinocytes with immunosuppressive properties for allogeneic cell-based wound therapy. *PLoS ONE* 2013, 8, e70408.
57. Gallico GG, O'Connor NE, Compton CC, Kehinde O, Green H. Permanent coverage of large burn wounds with autologous cultured human epithelium. *N Engl J Med* 1984; 311 (7): 448-51.
58. Dagalakakis N, Flink J, Stasikelis P, Burke JF, Yannas IV. Design of an artificial skin. Part III. Control of pore structure. *J Biomed Mater Res* 1980; 14 (July (4): 511-28.
59. Yannas IV, Burke JF, Gordon PL, Huang C, Rubenstein RH. Design of an artificial skin. II. Control of chemical composition. *J Biomed Mater Res* 1980; 14(March (2)): 107-32.
60. Dragunova, J.; Kabat, P.; Koller, J. Skin explant cultures as a source of keratinocytes for cultivation. *Cell Tissue Bank.* 2013, 14, 317–324.

61. Dragunova, J.; Kabat, P.; Koller, J. Skin explant cultures as a source of keratinocytes for cultivation. *Cell Tissue Bank*. 2013, *14*, 317–324.